

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra genetiky a mikrobiologie



Aptamery ovlivňující podjednotky eIF4F

Aptamers affecting eIF4F subunits

Bakalářská práce

Dana Kopperová

Školitel: Mgr. Zuzana Feketová

Praha 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a uvedla všechny prameny a použitou literaturu.

V Praze dne 30. 4. 2010

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce Mgr. Zuzaně Feketové za její vstřícnost, trpělivost a cenné rady při sepisování této práce. Poděkování patří i mé rodině za jejich podporu při studiu.

Abstrakt:

Eukaryotický translační iniciační faktor 4F se skládá ze tří podjednotek – eIF4A, eIF4G a eIF4E. Tyto podjednotky hrají klíčovou roli při iniciaci translace. eIF4G na svém povrchu váže jiné translační faktory. eIF4A je RNA dependentní helikáza, bez níž není iniciace translace možná. Také afinita eIF4E k čepičce je zvýšená pokud s eIF4G tvoří komplex. Pomocí metody Selex byly vytvořeny vysoce afinitní a specifické molekuly, které vážou různé povrchy a jiné molekuly v buňce - tzv. aptamery. Aptamer vázající eIF4A brání ATP hydrolýze. Proti eIF4G existuje více aptamerů, které jeho aktivitu ovlivňují různým způsobem, ale důsledek je stejný – bránění translaci. Také aptamer vázající eIF4E brání translaci a to tím, že znemožňuje vazbu na čepičku. Uvedené translační faktory jsou detekovatelné v nestandardních hodnotách při diagnóze nádorových onemocnění. Jejich aptamery by mohly být řešením při léčbě těchto onemocnění.

Klíčová slova:

eIF4A; eIF4E; eIF4G; RNA, DNA a peptidové aptamery; Selex

Abstract:

Eukaryotic translation initiation factor 4F comprises of three subunits – eIF4A, eIF4G and eIF4E. These subunits play a key role in translation initiation. On its surface eIF4G binds other translation factors. eIF4A is RNA dependent helicase that is crucial for translation initiation. Affinity of eIF4E towards cap is enhanced if it is in complex with eIF4G. Specific molecules with high affinity were prepared by Selex. These molecules that bind various surfaces and different molecules in the cell are called aptamers. Aptamer binding eIF4A inhibits ATP hydrolysis. Activity of eIF4G may be affected by more aptamers but all resulting in translation inhibition. Aptamer binding eIF4E also inhibits translation by hindering cap binding. All of these translation factors may be detected in non-standard values in tumors. Aptamers against these proteins might bring a solution in the tumor treatment.

Key words:

eIF4A; eIF4E; eIF4G; RNA, DNA and peptide aptamers; Selex

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Metody a charakteristika jednotlivých agens	2
2.1	Selex	2
2.1.1	Selex	2
2.1.2	Cell-Selex	3
2.2	Aptamery	5
2.2.1	Peptidové aptamery	5
2.2.2	DNA a RNA aptamery	5
2.3	Eukaryotický iniciační translační faktor 4F	8
2.3.1	eIF4E	8
2.3.2	eIF4A.....	9
2.3.3	eIF4G.....	10
3	Vliv aptamerů na vybrané translační faktory	10
3.1	eIF4E	10
3.1.1	eIF4E translační faktor a jeho aptamery	10
3.1.2	Struktura eIF4E	11
3.1.3	Aptamery a jejich vlastnosti	11
3.1.4	Rozdíly mezi lidským a kvasinkovým eIF4E	14
3.2	eIF4A.....	17
3.2.1	eIF4A translační faktor a jeho aptamery	17
3.2.2	Příprava aptamerů	18
3.2.3	Kooperativní interakce mezi RNA aptamery a eIF4A doménami	19
3.2.4	Vliv aptamerů na ATPázovou aktivitu	19
3.2.4.1	Struktura AUCGCA smyčky aptameru 15 (APT15).....	20
3.2.4.2	Struktura ACAUAGA smyčky aptameru 16 (APT16)	21
3.3	eIF4G.....	22
3.3.1	eIF4G translační faktor a jeho aptamery	22
3.3.2	Příprava aptamerů a jejich vlastnosti	23
4	Výhody a nevýhody využívání aptamerů v klinické praxi.....	25
4.1	Vznik aptamerů	25
4.2	Využití v klinické praxi.....	25
5	Závěr.....	27
6	Použitá literatura	30

1 Úvod

Při pročítání literatury o translaci, jejích faktorech a problémech s ní spojených jsem narazila na téma aptamerů. Velice mě zaujaly, protože na přednáškách ani v žádné běžně dostupné studijní literatuře nejsou zmiňovány. Po nastudování více článků mi připadalo zajímavé pokusit se zpracovat informace o nich v práci zahrnující problematiku translace a ovlivnění činnosti translačních faktorů.

V druhé kapitole přibližuji postup získávání aptamerů metodou Selex, která byla vymyšlena a použita v roce 1990 Tuerkem a Goldem. V Selexu vznikají DNA a RNA aptamery, zatímco peptidové aptamery, které se objevují později, se získávají pomocí dvouhybridového systému kvasinek. Aptamery všech druhů jsou vysoce afinitní, specifické molekuly, které se vážou na různé struktury buněčného povrchu a na molekuly uvnitř buňky. Translační faktory jsou jedni z nich. Zaměřila jsem se na eukaryotický iniciační translační faktor eIF4F, který je složený ze tří podjednotek eIF4E, eIF4G, eIF4A. Činnost podjednotek je zároveň významná v regulaci buněčných procesů a projevů nádorových onemocnění.

V třetí kapitole popisují vliv aptamerů na translační faktory komplexu eIF4F. V této části vycházím pouze z několika málo článků, přesto podle mého názoru podávají dostatečný náhled na funkci aptamerů a způsob ovlivňování těchto faktorů. Bohužel tato problematika ještě není zcela prozkoumána a věnuje se jí pouze omezený počet vědeckých skupin, ale věřím, že časem se trend aptamerů rozšíří a informací o regulaci translace bude přibývat.

Poslední kapitola hlavní části je věnována aptamerům a jejich využití v klinické praxi. Nemoce jsou jedním z běžných témat ve společnosti (zejména nádorová onemocnění, o kterých se zmiňuji v kapitole 4.2), proto by mohly být právě aptamery novou možností jak efektivně a levně nemoci léčit.

2 Metody a charakteristika jednotlivých agens

2.1 Selex

Selex je zkratka pro Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (systematický vývoj ligandů na základě exponenciálního růstu). Níže jsou popsány dvě hlavní skupiny, které v podstatě pokrývají to nejdůležitější z metody, jejich podskupiny jsou pouze zmíněny pro ucelení informací.

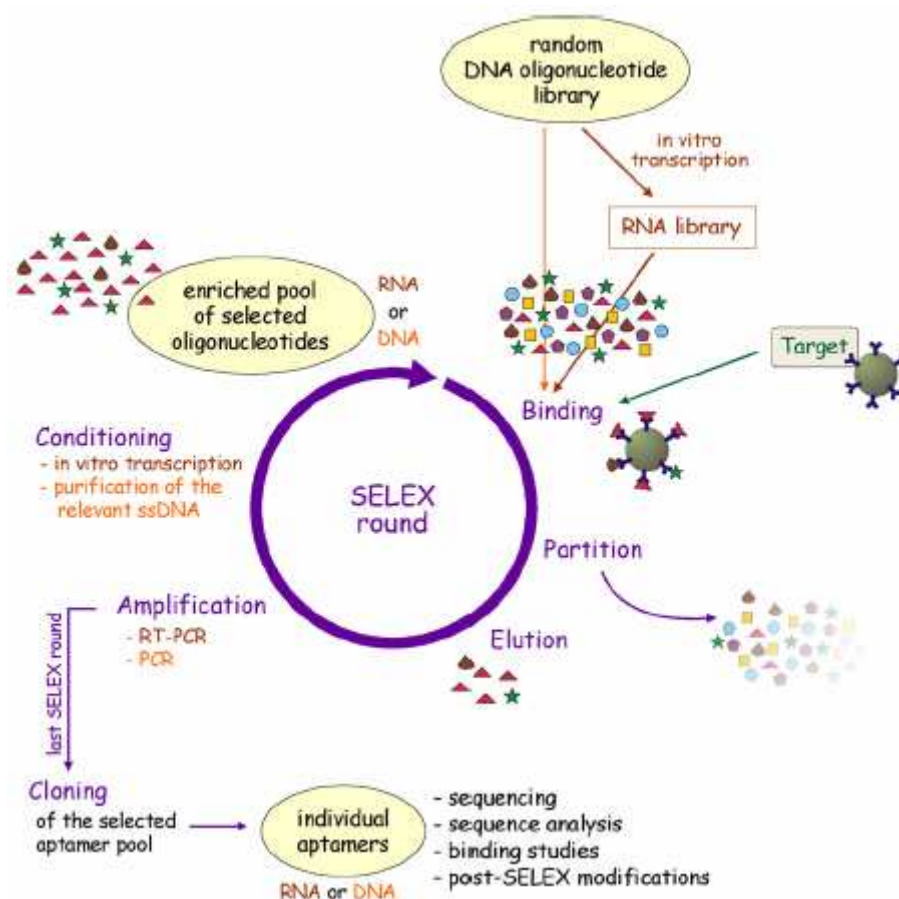
2.1.1 Selex

Metoda Selex byla poprvé popsána v roce 1990 Tuerkem a Goldem, kteří tento postup rozvinuli při výzkumu T4 bakteriofága ve snaze pochopit jeho translační a transkripční pochody. Selex je založen na schopnosti dvou molekul se na sebe vzájemně vázat, tyto „komplexy“ můžeme díky tomu odlišit od ostatních látek přítomných v roztoku.

Vysoce komplexní knihovnu náhodných DNA molekul (10^{15} - 10^{16} oligonukleotidů) smícháme s látkou, ke které hledáme vhodnou molekulu pro vazbu. Navázané molekuly, po vymytí všeho ostatního, namnožíme pomocí PCR, která je součástí Selexu. Kroky, jako je navázání se, oddělení od ostatních nenavázaných molekul a odmytí, je nutné provést několikrát. Jsou práce, kdy se cykly opakují i 20krát (Stoltenburg *et al.* 2007), viz obr. 1. Tímto opakováním získáváme vysoce afinitní, specifické, krátké, jednovláknové nukleové kyseliny s funkčními smyčkami. Hlavní funkcí smyček jsou právě interakce. Molekuly, s těmito vlastnostmi, nazýváme aptamery (Tuerk *et al.* 1990). Touto metodou získáme buď DNA nebo RNA aptamery, podle toho zda vycházíme z DNA knihovny nebo *in vitro* transkripcí vytvoříme RNA knihovnu. Pokud pracujeme s RNA aptamery, pak pro amplifikaci sekvencí musíme použít RT-PCR.

Metoda Selex byla propracována a rozdělena dle povahy průběhu a vznikajících produktů na podskupiny Genomic Selex, Neutral Selex a Multiplexed massively parallel Selex (MMPS). Genomic Selex je pozměněná metoda Selexu, která generuje z genomu RNA nebo DNA sekvence, které se vážou na cílené molekuly a nazýváme je genomové aptamery (Lorenz *et al.* 2010). Neutral Selex se liší od Selexu tím, že vynechává selekční krok, tudíž se amplifikují všechny sekvence vznikající po „evolučním“ kroku (Zimmermann *et al.* 2010). MMPS je metoda, která je zaměřená na analýzu velkého množství transkripčních faktorů (Jolma *et al.* 2010).

Za aptamery považujeme také specificky upravené peptidy, které nezískáváme Selexem, ale z peptidové knihovny pomocí dvouhybridového kvasinkového systému, takto vyselektované proteinové aptamery můžeme dále klonovat v bakteriích (Buerger *et al.* 2003).



Obrázek 1 Selex

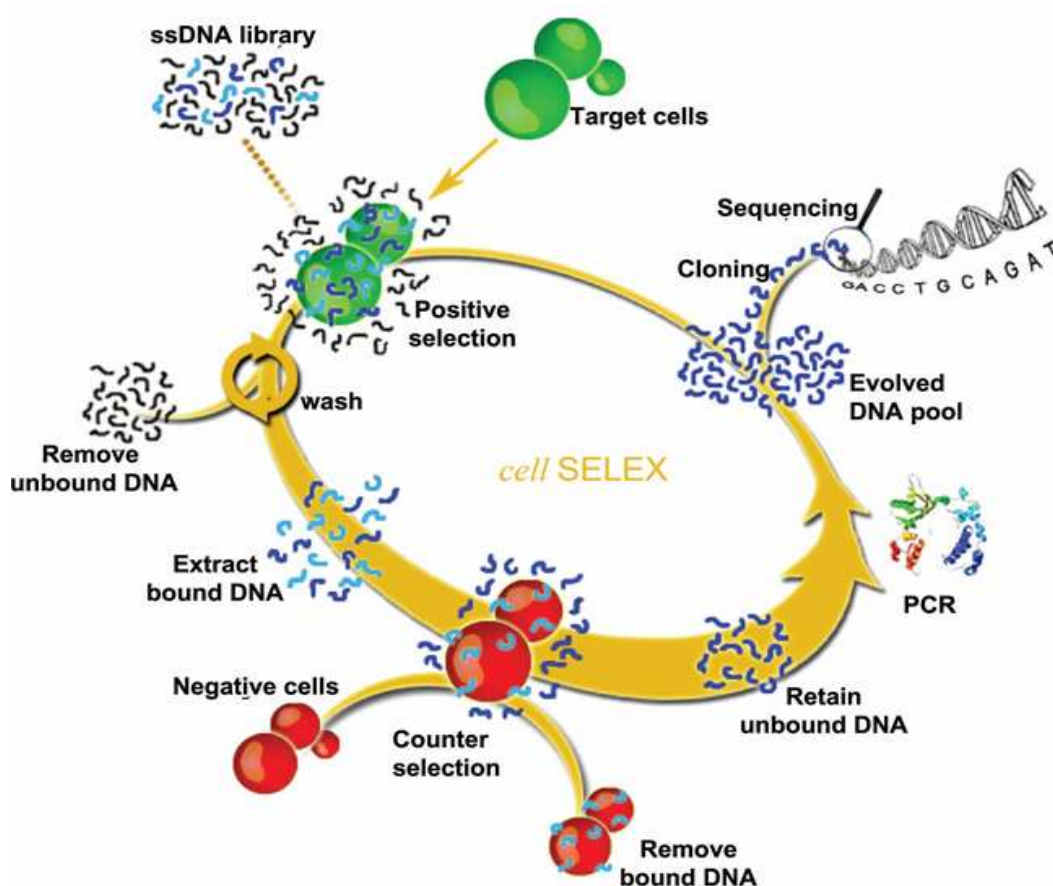
In vitro metoda, která selektuje z velkého množství molekul (DNA nebo RNA) vysoce afinitní a specifické sekvence vázající se na určitou molekulu. V prvním kroku se navážou specifické oligonukleotidy, zbylé jsou z roztoku vymyty. Tyto navázané oligonukleotidy se uvolní z nosné molekuly a jsou namnoženy pomocí PCR (RT-PCR u RNA). Namnožené oligonukleotidy se znovu přidají k cíleným molekulám a kroky se opakují. Cykly mohou být provedeny až 20krát (Stoltenburg *et al.* 2007).

2.1.2 Cell-Selex

Cell – Selex je novější verze Selexu, kdy se zaměřujeme přímo na buňky a díky cílení na jejich povrch jsme schopni rozlišit různé buňky, ale co je hlavní, jsme schopni rozlišit mezi buňkami stejného typu z různých generací a v různých růstových fázích. Tohoto rozlišování se snaží vědci využít hlavně při terapii a diagnostice nádorových buněk a jiných onemocnění (Guo *et al.* 2008). Zajímavé a odlišné od metody Selex je to,

že na začátku není potřeba znát proteiny ani struktury na povrchu buňky, protože aptamery jsou vybírány nejen pomocí pozitivní selekce-nádorové buňky, ale také pomocí negativní kontroly-zdravé buňky. Při negativní kontrole se právě navázané molekuly odstraňují jako látky nežádoucí, protože nejsou specifické pro nádorovou nebo jinak specifickou buňku. Pro další zpracování se tedy použijí molekuly, které po negativní kontrole zůstaly nenavázané, viz obr. 2 (Fang *et al.* 2009).

Dále se dělí na Cell Surface Selex (CS-Selex) a na Differential Selex. CS-Selex byl vytvořen pro rozlišení E2 obalového glykoproteinu HCV. Pro selekci ssDNA aptameru byly použity buňky CT26, které exprimovaly na svůj povrch tento protein. Jako negativní kontrola byly použity netransformované buňky CT26 (Chen *et al.* 2009). Differential Selex byl vytvořen pro odlišení dvou velmi podobných fenotypů buněk u daného typu rakoviny, aniž bychom dopředu znali dané epitopy buněk (Cerchia *et al.* 2009).



Obrázek 2 *In vitro* metoda Cell-Selex

Na povrch transformovaných buněk se navážou molekuly, které po odstranění nenavázaných molekul odmyjeme z povrchu a vysektujeme je pomocí negativní kontroly. Nenavázané molekuly na negativní kontrolu jsou námi hledané aptamery, které dále zpracováváme jako u Selexu (Fang *et al.* 2009).

2.2 Aptamery

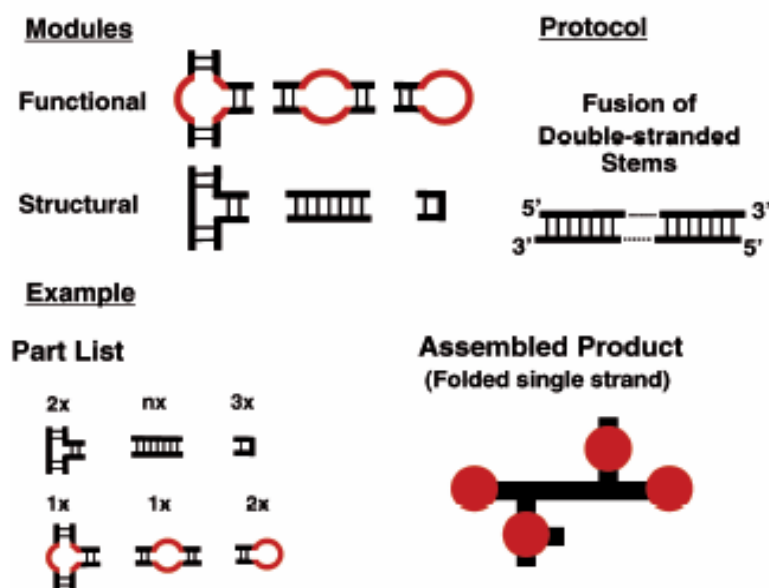
2.2.1 Peptidové aptamery

Peptidové aptamery jsou vybrány z knihovny peptidů s vysokou komplexitou. Jsou to jednoduché oligopeptidy s velikostí kolem 20. aminokyselin, které rozpoznávají a označují molekuly, proti kterým účinkují (Buerger *et al.* 2003). Jiná definice aptameru říká, že jde o protein vytvořený z variabilní proteinové sekvence vložené do vedoucího proteinu s konstantní sekvencí (Cohen *et al.* 1998). Podobně jako protilátky, jsou schopné vázat různé epitopy (Colas *et al.* 1996), ale narozdíl od nich mají řadu výhod: jsou menší a díky tomu snadněji vstupují do buněk, lépe se odstraňují z těla, jejich výroba je snazší a levnější (Guo *et al.* 2008).

Peptidové aptamery brání enzymatické aktivitě proteinů, umí změnit protein-proteinové interakce, tím ovlivnit funkci proteinu a následně fenotyp buňky. Při lokalizaci různých proteinů v buňce pomocí peptidových aptamerů, byla zjištěna jejich specifická vlastnost - lokalizované proteiny inhibovat. Do aptameru se dají také přidat další domény, které rozšiřují jeho inhibiční schopnosti (Buerger *et al.* 2003). Těchto vlastností se snaží vědci využít při získávání poznatků o genetických a biochemických příčinách zhoubných nádorů. Například byl vytvořen aptamer k zastavení aktivity Stat3 proteinu, jehož hlavní role je v proliferaci a přežívání buňky. Aptamer rozeznává Stat3 DNA vazebnou doménu a brání transaktivaci epidermálního růstového faktoru (EGF) a tím růstu buňky (Nagel-Wolfrum *et al.* 2004).

2.2.2 DNA a RNA aptamery

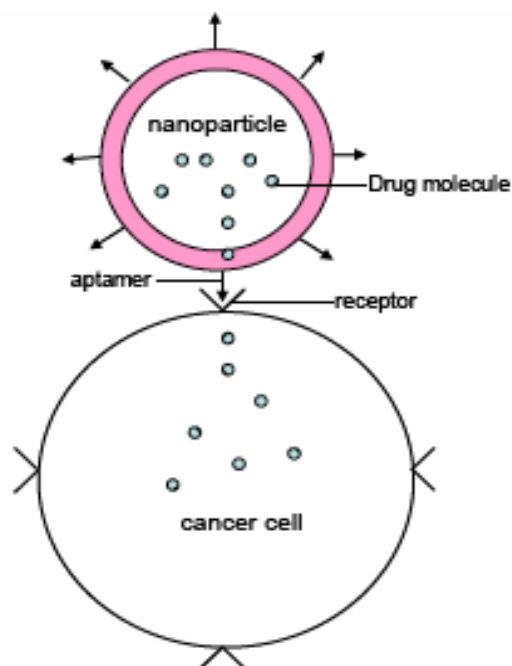
DNA nebo RNA aptamery se účinně vážou mimo jiné na translační (Xu *et al.* 2001) a transkripční faktory (Fan *et al.* 2005) a různé jiné proteiny, i na virové (Umehara *et al.* 2004). Vložené variabilní úseky, umístěné přibližně do středu molekuly, jsou dlouhé 20 až 40 basí a jsou ohraničené sekvencemi, na které nasedají primery (Tuerk *et al.* 1990; Ellington *et al.* 1992). Dá se na ně pohlížet i jako na funkční jednotky, které nesou smyčky spojující se s různými strukturními částicemi, viz obr. 3. Bez ohledu na to, jakou mají strukturu, lze každé smyčce přiřadit vlastní funkci (Xu *et al.* 2009).



Obrázek 3 Struktura funkčních elementů, které se skládají do aptamerů pomocí dvouřetězcových stonků (Xu *et al.* 2009).

Aptamery nukleových kyselin mají všeobecně krátkou životnost (několik minut až hodin) a v těle jsou navíc rychle degradovány v ledvinách (Guo *et al.* 2008). Proto se v dnešní době vědci snaží dostat tyto látky do těla a ke konkrétní molekule co nejrychleji a nejefektivněji. Kromě toho, že se váží na molekuly uvnitř buňky a tím ovlivňují jejich funkci, jsou schopné rozlišit dvě buňky stejného typu v různém stadiu života (Guo *et al.* 2008) a přivádět k nim funkční molekuly a látky (McNamara *et al.* 2006). McNamara *et al.* popsali metodu v níž využívají vlastnosti RNA aptamerů a siRNA. Vytvořili chimerickou RNA: aptamer-siRNA, kdy se aptamer váže na buňku a dopravuje tak funkční siRNA ke konkrétním genům (McNamara *et al.* 2006). Jiná možnost, jak přivést funkční látky do buňky, je využití nanočástic. Na povrchu nanočástic jsou navázané aptamery, které jsou cílené proti konkrétnímu povrchu na buňce. Účinné látky se po kontaktu částice s buňkou dostávají do buněk a k molekulám, se kterými reagují a ovlivňují procesy v buňce, viz obr. 4 (Smith *et al.* 2007).

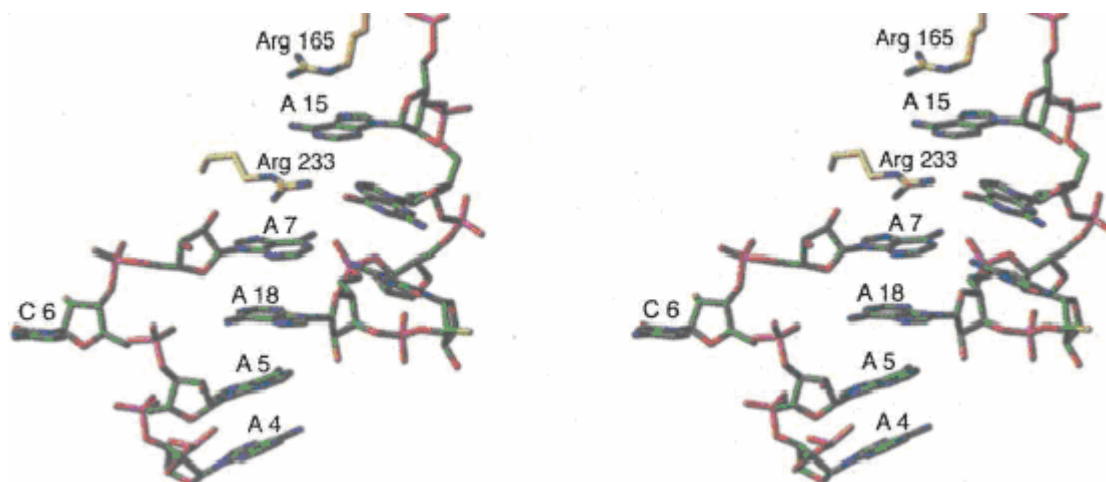
Dále se aptamery dají různě modifikovat a tím upravovat jejich afinitu, která je pro jejich funkčnost důležitá. To například popisují Rusconi *et al.* při přípravě aptamerů proti trombinu. Zjistili, že cholesterolem modifikovaný aptamer má větší afinitu než jeho mutant a než jeho původní forma (Rusconi *et al.* 2004).



Obrázek 4 Aptamery navázané na nanočástici slouží jako vazebný agens s poškozenou buňkou. Po navázání se na buňku, se do ní vylijí funkční molekuly (Smith *et al.* 2007).

Jako nejlépe prostudovaná krystalická struktura DNA aptameru s proteinem, který v přirozených podmínkách neváže nukleovou kyselinu, se udává právě vazba s trombinem. Na vazbě se podílí van der Waalsovy síly a vodíkové můstky, terciární struktura DNA je stabilizována strukturou nazývanou G-quadruplex. Ten je stabilizován pomocí draselného kationtu (Macaya *et al.* 1993; Padmanabhan *et al.* 1993). Na trombin se váže jak DNA aptamer (Wu *et al.* 1992), tak i RNA aptamer, ale každý do jiného místa (Bode *et al.* 1992). RNA aptamer má vlásenkovou strukturu s vnitřní bublinou. Interakce jsou zajištěné kovalentní vazbou, iontovou vazbou, vodíkovými můstky a van der Waalsovými silami. Také RNA aptamer je stabilizován pomocí iontů, ale na rozdíl od G-quadruplexu zde hrají stabilizační roli dvojmocné kationty hořčíku nebo vápníku. U interakce RNA aptameru s trombinem byla poprvé popsána střídající se vazba adeninu s argininem (obr.5), kterou Long *et al.* nazývají jako A-Arg zipper (Long *et al.* 2008).

Podle výzkumů Feigona *et al.* jsou interakce argininu s adeninem ojedinělé, zatímco s guaninem jsou popisovány jako časté (Feigon *et al.* 1996). Naopak Morozova *et al.* popisují interakce argininu s adeninem, cytosinem a uracilem jako běžné, ale interakce s guaninem jako méně časté (až 4krát méně než s adeninem) (Morozova *et al.* 2006).



Obrázek 5 A-Arg zipper popisuje skládání argininů a adeninů střídavě nad sebe („stacking“). Argininy jsou zvýrazněné žlutě, adeniny zeleně (Long *et al.* 2008).

2.3 Eukaryotický iniciační translační faktor 4F

Translační iniciační faktory (IF) usnadňují cílení a nasedání ribozomů na messenger RNA (mRNA) a rozpoznání start kodónu iniciátorovou tRNA. U eukaryot známe eIF2, eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5, eIF4F, volné eIF4A, eIF4B (podrobnější informace o iniciačních faktorech lze najít v monografii Hinnebusch *et al.* 2007).

Eukaryotický translační iniciační faktor 4F se skládá ze tří podjednotek – eIF4A, eIF4G a eIF4E, a s pomocí dalších faktorů je zodpovědný za vazbu ribozomů na mRNA v cytosole.

2.3.1 eIF4E

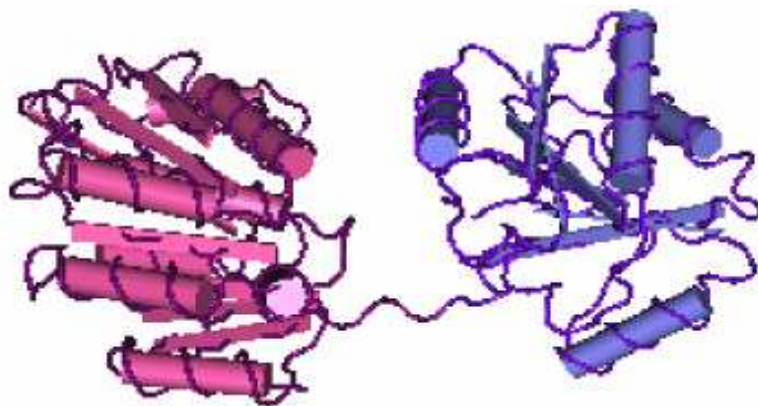
eIF4E rozpoznává čepičku na 5'konci mRNA a má kontrolní roli v iniciaci translace. Skládá se z osmi antiparalelních řetězců a třech dlouhých helixů, které jsou doplněné o tři krátké helixy (Matsuo *et al.* 1997). Jeho afinita k čepičce se zvyšuje přibližně 16krát, pokud tvoří komplex s eIF4G (Yanagiya *et al.* 2009). eIF4E se v buňce vyskytuje desetkrát častěji než eIF4G, přesto se vážou v poměru 1:1. Bylo prokázáno, že ztráta až dvou třetin eIF4E z buňky nemá žádný vliv na translaci. Podmínkou pro iniciaci translace je koncentrace jeho aktivní formy (von der Haar *et al.* 2002) a její nadbytek může vést až k nádorovému bujení (Spivak-Kroizman *et al.* 2002).

Aktivita eIF4E je ovlivňovaná mimo jiné i 4E-vazebnými proteiny (4E-BP), které se vážou do stejných vazebných míst jako eIF4G. Tyto vazebné proteiny brání

interakcím s eIF4G faktorem (Gingras *et al.* 2001), ale nebrání eIF4E vazbě s čepičkou, naopak pokud čepička s eIF4E tvoří komplex, pak 4E-BP tuto vazbu ještě upevňuje (Ptushkina *et al.* 1999).

2.3.2 eIF4A

eIF4A je RNA dependentní ATPáza s helikázovou aktivitou - rozvolňuje sekundární strukturu mRNA na její 5'-UTR (nepřekládaná oblast). Skládá se ze dvou domén, které podstupují konformační změny po navázání ATP, a tyto domény tvoří „dumbbell“ strukturu (Caruthers *et al.* 2000). Dumbbell struktura je v podstatě činkovitá struktura, jak název napovídá. Dvě globulární domény jsou na svých N-koncích spojeny 11ti aminokyselinovými zbytky (Cheng *et al.* 2005), viz obr. 6. Helikázová aktivita faktoru eIF4A je zvyšována kofaktorem eIF4B (Rozen *et al.* 1990). eIF4A tvoří vazby s eIF4G a u savců se váže na dvě místa na eIF4G do M-části (middle domain-centrální část) a do C-koncové části eIF4G. Zatímco u kvasinek se váže pouze na jedno místo, protože kvasinkovému eIF4G chybí C-koncová část (Oberer *et al.* 2005).



Obrázek 6 Struktura eIF4A, dvě domény spojené na svých N-koncích 11-ti aminokyselinovými zbytky, díky kterým vypadá struktura jako činka „dumbbell“. Pro obrázek byla použita struktura ze *S. cerevisiae* 2VSX_A z NCBI databáze.

Narozdíl od ostatních iniciačních faktorů je eIF4A v buňce přítomný mnohem častěji. Conroy *et al.* uvádí přítomnost až třikrát častěji než je ribosom (Conroy *et al.* 1990). Novější studie dokazují, že je tato hodnota ještě vyšší. eIF4A se v buňce vyskytuje v koncentraci čtyřikrát až pětkrát vyšší než je koncentrace ribosomu (Holstege *et al.* 1998). eIF4A je netypický v tom, že se vyskytuje i samostatně a ne jen v komplexu eIF4F (Conroy *et al.* 1990).

2.3.3 eIF4G

eIF4G je „scaffold protein“ – slučuje hlavní iniciační faktory jako je například eIF3, eIF4E aj. Je složen ze 3 domén: N-koncové, střední a C-koncové. U savců se vyskytují dvě isoformy tohoto faktoru 4GI a 4GII. Tyto isoformy jsou ze 46% identické a i jejich funkce je víceméně stejná (Gradi *et al.* 1998). eIF4G kvasinky *S. cerevisiae* ještě také interaguje s faktory eIF1 a eIF5 (He *et al.* 2003).

N-koncová část je důležitá pro vazbu s poly(A)-vazebným proteinem (PABP) a s eIF4E. Je to jedna z nejvýznamnějších vazeb pro šetření energie buňky a času u translačních procesů. Tyto vazby způsobují stočení mRNA (Wells *et al.* 1998) a tím usnadňují znovunavázání ribosomu a urychlují tak vstup do další translace. Centrální část váže eIF3, eIF4A a obsahuje sekvence pro vazbu s mRNA (Pyronnet *et al.* 1999; Korneeva *et al.* 2000). Pozorování kooperativních interakcí mezi eIF4G a eIF4A naznačuje, že střední část eIF4G tvoří svorku, která stabilizuje uzavřenou konformaci eIF4A, která je jeho aktivní formou (Oberer *et al.* 2005). C-koncová část má druhé vazebné místo pro eIF4A a váže protein kinázu Mnk1 (více v monografii Hershey *et al.* 2000), MAP kináza Mnk-1 je díky této vazbě dostatečně blízko pro fosforylaci eIF4E.

3 Vliv aptamerů na vybrané translační faktory

Existují i aptamery proti dalším translačním faktorům, ale pro tuto práci jsem si vybrala pouze 3 faktory, které tvoří podjednotky eIF4F. Tento faktor je zodpovědný za iniciaci translace. Aktivací nebo inhibicí jeho podjednotek ovlivňujeme řadu procesů v buňce, které mohou vést až k nádorovým onemocněním.

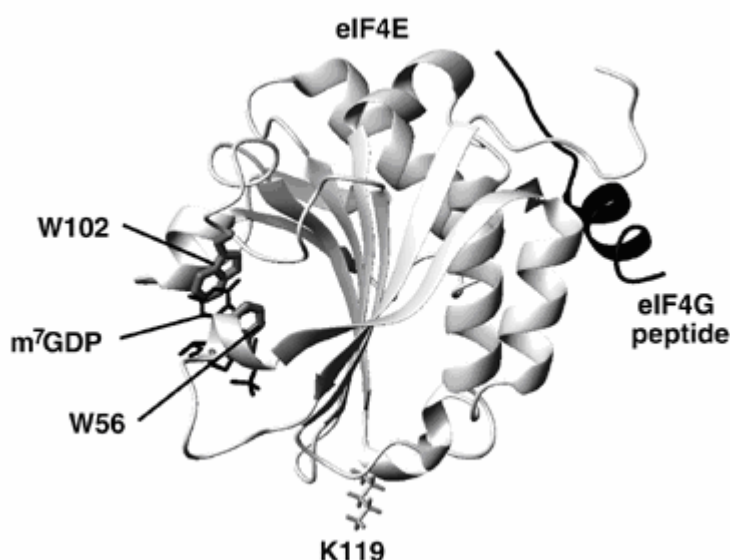
3.1 eIF4E

3.1.1 eIF4E translační faktor a jeho aptamery

Jak již bylo řečeno v kapitole 2.3.1, koncentrace eIF4E v aktivním stavu je limitující hodnotou pro iniciaci translace, protože rozeznává čepičku a díky vazbě na ní má vliv na translaci. Jeho nadlimitní koncentrace je významná při vzniku nádorového bujení. Kromě iniciace translace má eIF4E také transportní funkci – exportuje některé mRNA z jádra, nejlépe prokázané je to v případě cyklinu D1 (Culjkovic *et al.* 2005). Jeho aktivita

je ovlivňována například i vazbou s jaderným PML (promyelocytic leukemia protein). PML díky vazbě na eIF4E výrazně snižuje vazbu na čepičku. Brání exportu cyklin D1 mRNA z jádra a tím inhibuje transformaci a růst buňky. Porušení vazby s PML může vést až k propuknutí akutní myeloidní leukemie (Cohen *et al.* 2001).

3.1.2 Struktura eIF4E



Obrázek 7 Krystalová struktura ternárního komplexu myšního eIF4E. Jsou vyznačená místa, kam se váže 7-methyl-GDP s konzervovanými tryptofany a eIF4G peptid (Volpon *et al.* 2006).

Na struktuře eIF4E rozeznáváme dvě vazebná místa. Jedno je na konkávní straně pro vazbu čepičky. V místě zprostředkovávajícím vazbu na čepičku jsou dva konzervované tryptofany (W56 a W102), které podporují rozpoznání analogu čepičky m⁷guanosinu. Druhé místo je na konvexní straně, kam se vážou 4E-vazebné proteiny nebo translační faktor eIF4G, viz obr. 7 (Volpon *et al.* 2006). Proteiny eIF4G a 4E-BP mají na vazebné straně motiv YXXXXLΦ, kde X je jakákoliv aminokyselina a Φ je hydrofobní zbytek aminokyseliny. Regulační proteiny s tímto motivem jsou zatím jediné regulační proteiny pro eIF4E, které mají prostudovanou strukturu (Volpon *et al.* 2009).

3.1.3 Aptamery a jejich vlastnosti

Pro izolaci aptamerů byly použity his-značené myšší eIF4E a RNA „pool“, které se liší na 40ti nukleotidových pozicích. His-značené eIF4E na sebe vázaly specifické RNA molekuly a tento komplex se přes His-eIF4E zachytával na Ni-NTA agarozu. Po 14ti opakováních

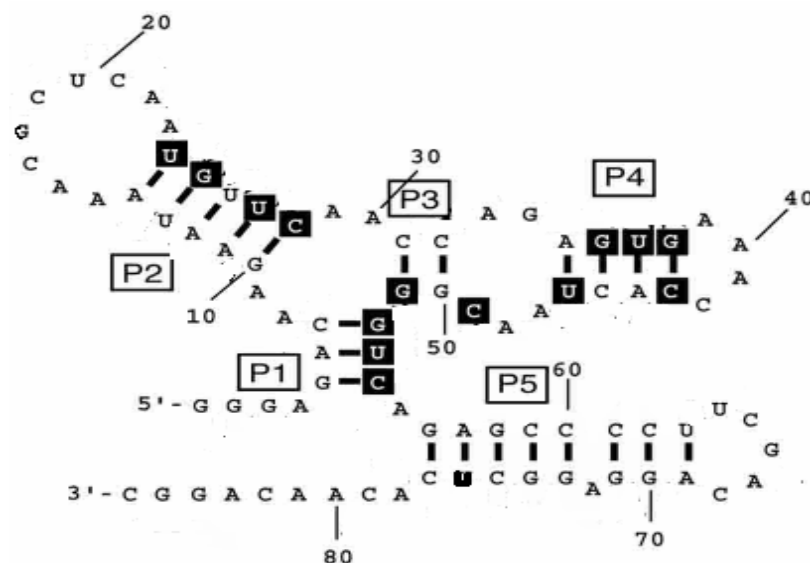
selekce bylo izolováno 144 RNA molekul, které byly osekvenovány. Sekvence odhalila 9 typů aptamerů, které nesdílí žádný společný motiv. Z těchto 9ti typů aptamerů byly vybrány pouze dva, které efektivně vážou myší eIF4E (aptamer1 a aptamer2). Přestože se myší faktor liší od lidského faktoru ve čtyřech aminokyselinách, aptamer vytvořený pro myší eIF4E váže lidský eIF4E stejně efektivně, ale neváže se na kvasinkový (*S. cerevisiae*) eIF4E (Mochizuki *et al.* 2005), viz obr. 10. Srovnání sekvencí jednotlivých eIF4E bylo vytvořeno pomocí programu ClustalW 1.83 (DNA Databank of Japan, <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>). Při porovnání sekvencí lidského a kvasinkového proteinu jsem zjistila drobné rozdíly, které jsou zásadní pro vazbu aptameru, hlavně ve složení a orientaci aminokyselin v sekvenci. Výsledky porovnání jsou podrobněji popsány v závěru kapitoly 3.1.

Pro zkoumání jak aptamer1 a aptamer2 interaguje s čepičkou, byl použit její analog m⁷guanosin. Z výsledků bylo patrné, že čím více aptameru bylo v roztoku, tím menší byla vazba eIF4E na čepičku. Aptamer1 má větší inhibiční vliv na vazbu k čepičce než aptamer2, proto byl vybrán pro podrobnější prozkoumání (Mochizuki *et al.* 2005).

Dále se ukázalo, že aptamer1 neinhibuje vazbu eIF4E•4E-BP, díky tomu mohou společně tvořit ternární komplex. Tyto výsledky značí, že aptamer1 se váže do jiného místa než eIF4G a 4E-BP (Mochizuki *et al.* 2005).

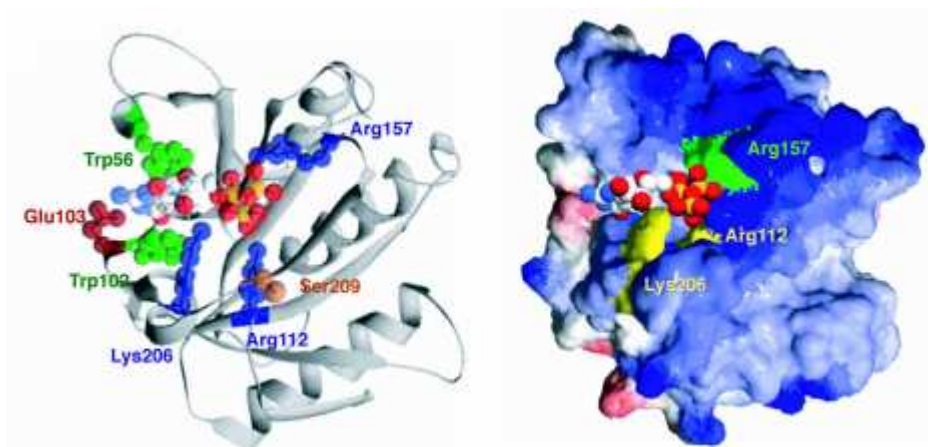
Aptamer1 je 86 nukleotidů dlouhá molekula, viz obr. 8, u které se předpokládá, že se může skládat do nejméně tří různých sekundárních struktur (Zuker 2003). Pro zkoumání vlivu aptameru1 na iniciaci translace byla vybrána jeho struktura s nejnižší volnou energií. Tento typ aptameru1 obsahuje pět vlásenkových struktur se stonky (P1-P5) a na 5'-konci má čtyři volné nukleotidy, zatímco na 3'-konci má devět volných nukleotidů. Deleční analýzy ukázaly, že 5'-konec je postradatelný ve vazbě na faktor eIF4E, zatímco P2 je pro vazbu nutný a 3'konec, kterému předchází P5, je pro vazbu rozhodující (Mochizuki *et al.* 2005).

Protože do té doby nebyl známý mechanismus vazby s aptamerem, snažili se určit, které aminokyseliny jsou nutné pro vazbu aptameru a jak ovlivňuje vazbu s čepičkou. Pomocí mutagenese eIF4E zjistili, že aptamer se váže přes elektrostatické interakce s Arg112 a Lys206 (Mochizuki *et al.* 2005). Tyto aminokyseliny jsou v blízkosti konkávního povrchu eIF4E a interagují s gama fosfátem z m⁷GTP (Niedzwiecka *et al.* 2002). Gama fosfát zároveň interaguje s Arg157, což je důležité pro vazbu čepičky, ale neovlivňuje vazbu aptameru (Mochizuki *et al.* 2005).



Obrázek 8 Struktura aptameru 1. Aptamer obsahuje pět stonků, které propojují smyčky. Na 5'konci jsou 4 volné nukleotidy, zatímco na 3'konci je 9 volných nukleotidů; upraveno podle (Mochizuki *et al.* 2005)

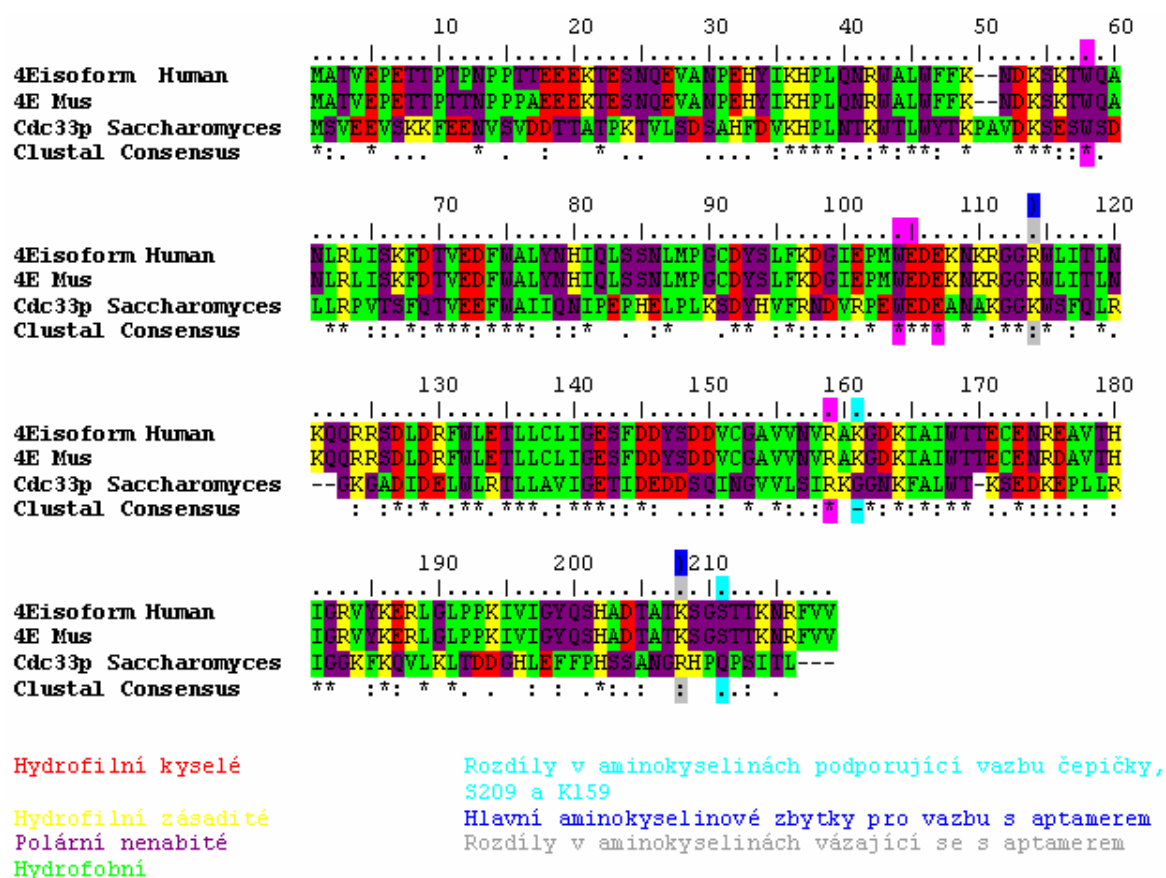
Jak je patrné z obr. 9 v oblasti vazby aptameru jsou aminokyseliny vázající se s čepičkou (Glu103 stabilizuje vazbu čepičky (Morino *et al.* 1996) a Trp56 a Trp102 s ní mají tzv. „stacking“ (patrové) interakce (Marcotrigiano *et al.* 1997)), ale jejich mutace kupodivu nemění vazebné interakce s aptamerem. Z těchto výsledků vyplývá, že navázaný aptamer blokuje vstup do žlábků eIF4E a stíní Arg157, čímž čepička brání v interakcích, které jsou potřebné k iniciaci translace.



Obrázek 9 Struktura eIF4E s vazebnými místy pro vazbu aptameru a čepičky. Na levo vidíme vazbu čepičky, která požaduje přítomnost Trp56, Trp102 a Arg157; Glu103 pomáhá vazbu stabilizovat. V pravo je znázorněná vazba aptameru přes Lys206 a Arg112, Arg157 je aptamerem zastíněn (Mochizuki *et al.* 2005).

3.1.4 Rozdíly mezi lidským a kvasinkovým eIF4E

Při porovnávání lidského a kvasinkového eIF4E a jejich sekvencí jsem vycházela z pozorování popsanych výše. Zaměřila jsem se na rozdílné rozmístění aminokyselin v klíčových místech pro vazbu aptameru a čepičky. Ze sekvenční analýzy (obr. 10) lidského a kvasinkového eIF4E nebylo zcela patrné, proč se aptamer vázající lidský translační faktor neváže i na kvasinkový eIF4E. Při srovnání lidského a kvasinkového eIF4E mají aminokyseliny v klíčových bodech pro vazbu čepičky nebo aptameru stejné vlastnosti - polární nenabitě (W56, W102 – značené světle fialovým obdelníčkem u srovnávaných oblastí), hydrofilní zásadité (R112, K206 – značené šedým obdelníčkem u srovnávaných oblastí), viz obr. 10. Rozdíl je ale v tom, že kvasinkový eIF4E má aminokyseliny důležité pro vazbu s aptamerem (K114 a R205) jinak uspořádané než lidský eIF4E (R112 a K206; obě tato místa jsou v obr. 10 vyznačená šedým obdelníčkem u srovnávaných oblastí). Nicméně jde pouze o výměnu míst stejných aminokyselinových zbytků, navíc s velice podobnými vlastnostmi.



Obrázek 10 Sekvenční analýza lidského (Human) a kvasinkového (Saccharomyces) eIF4E. Pro srovnání je zobrazena i myši (mus) sekvence eIF4E. Hvězdička znázorňuje shodné aminokyseliny, dvojtečka označuje konzervovanou substituci aminokyselin, tečka značí semi-konzervovanou substituci aminokyselin.

Protože sekvenční analýza nebyla dostatečně průkazná, bylo nutné provést srovnání na základě strukturních odlišností. K tomuto porovnání sekvencí a také pro vytvoření obr. 12 a 13 jsem použila program Cn3D (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>). Smyčky, které mají pravděpodobně přímé interakce s aptamerem, se zdají být dostatečně odlišné proto, aby se aptamer specifický pro lidský eIF4E faktor nevázal na kvasinkový eIF4E, viz obr. 11.

Kvasinkový eIF4E (1AP8_A) tvoří více uzavřenou strukturu. Smyčka, která nese aminokyseliny pro vazbu s aptamerem, je u kvasinky kratší (pro další text jako hp-smyčka u kvasinky; pro lidský faktor v textu jako sgstt-smyčka) a je zvýrazněná červeně v dolní části obr. 11, kde chybějící aminokyseliny jsou nahrazené vlnovkami. Na obr. 12 a 13 jsou tyto odlišné sekvence zvýrazněné tmavě zeleně. U kvasinky navíc hp-smyčka obsahuje prostorově výraznější aminokyseliny His206 a Pro207, které mohou významně zasahovat do interakcí v samotném translačním faktoru a bránit navázání aptameru. Důležitý rozdíl, přestože je zdánlivě nevýrazný, je právě v záměně Lys a Arg na místech 114 a 205. Kdy Arg205 sousedí s His206 a Pro207, jejich těsné interakce mohou výrazně ovlivňovat přístupnost aptameru k vazbě s eIF4E.

```

          10      20      30      40      50      60
1AP8_A   1 msveevskkkfeenvsvddttatpktivlsdsahfdvkhPLNTKWTLWYTKPavDKSESWS 60
2V8W_A   1 matvepettptpnptteektesnqevanpehyikHPLQNRWALWFFKN~DKSKTWQA 58

          70      80      90     100     110     120
1AP8_A  61 LLRPVTSFQTVEEFW~AIIQNIPEpHELPLKSDYHVFNRNDVRPEWEDEANAKGGKWSFQL 119
2V8W_A  59 NLRLISKFDTVEDFWaLYNHIQLS~SNLMPGCDYSLFKDGIPEPMWEDEKNKRGGRWLITL 117

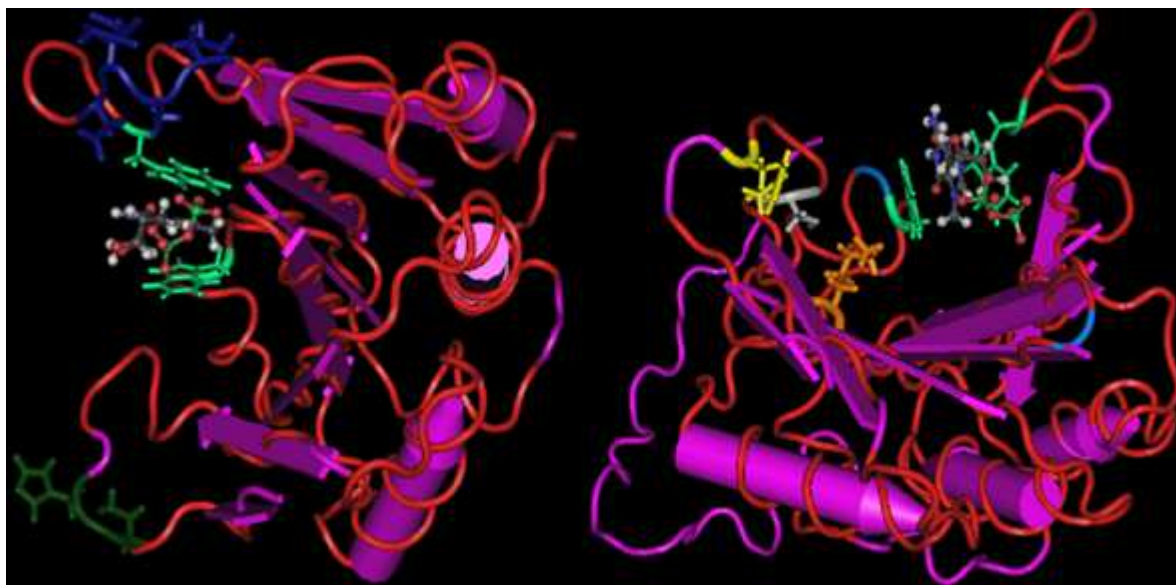
          130     140     150     160     170     180
1AP8_A 120 RGKG~ADIDELWLRTLLAVIGet~iDEDDSQINGVLSIRKGGNKFALWTKSE~DKEPLL 176
2V8W_A 118 NKQqRrSDLDLRFWLETLLCLIGesfDDYSDDVCGAVVNVRAKGDKIAIWTTECenREAVT 177

          190     200     210     220
1AP8_A 177 RIGGKFKQVLKLTDDGHLEFFPHSSANGrh~pQPSItl 213
2V8W_A 178 HIGRVYKERLGLPPKIVIGYQSHADTATksqsttKNRFvv 217

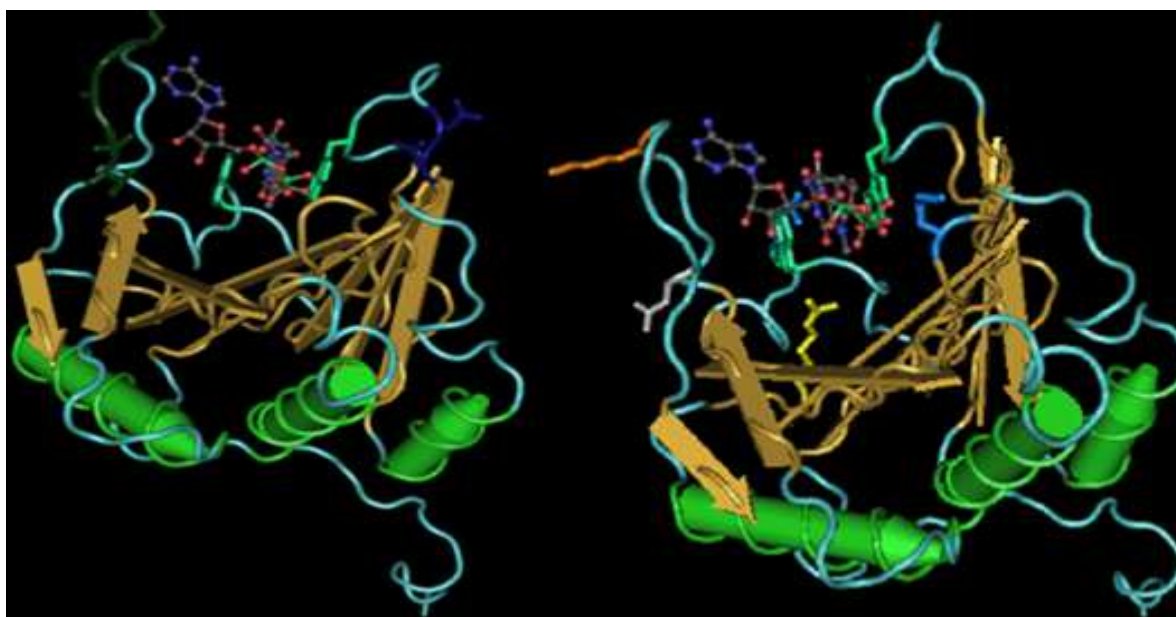
```

Obrázek 11 Sekvence dle struktury eIF4E, 1AP8_A (kvasinka) a 2V8W_A (lidské). Červeně zvýrazněná místa pravděpodobně ovlivňují vazbu s aptamerem a výrazně se liší.

Pro porovnání struktur kvasinkového a lidského eIF4E jsem si na NCBI vybrala strukturu 1AP8_A (kvasinka) a 1IPB (člověk). Mezi 2V8W_A z obr. 11 a 1IPB z obr. 13 není rozdíl ve složení aminokyselin. 1IPB byla jediná dostupná struktura, u které jsou naměřená data dostačující k stanovení celé struktury proteinu. U ostatních struktur pro lidský faktor



Obrázek 12 Struktura kvasinkového eIF4E s vyznačenými aminokyselinami zasahujícími do interakcí s aptamerem a čepičkou. Na levo je modře vyznačená část s aminokyselinami Pro50, Ala51, Val52, Asp53; zeleně jsou vyznačené His206 a Pro207. V pravo jsou vyznačené oranžově Lys114 a žlutě Arg205, mezi nimi šedě vyznačený Ser201. Pro lepší orientaci jsou v obou strukturách světle zeleně zvýrazněné Trp58 a 104, nutné pro vazbu čepičky, která je také vyznačená.



Obrázek 13 Struktura lidského eIF4E s vyznačenými aminokyselinami zasahujícími do interakcí s aptamerem a čepičkou. Na levo jsou tmavě modře značené aminokyseliny na kratší kličce – Asn50 a Asp51; na delší kličce jsou tmavě zeleně vyznačené Ser207, Gly208, Ser209, Thr210 a Thr211. Na pravo jsou značené aminokyseliny zasahující do vazby s aptamerem – žlutý Arg112 a oranžový Lys206, mezi nimi šedě značený Asp202. Pro lepší orientaci v obrázku jsou v obou strukturách světle zeleně zvýrazněné Trp56 a 102 vázající bivalent čepičky.

chybí větší část sgstt-smyčky (na obr. 11 zvýrazněné červeně), která je nestrukturovaná a hůř se měří. Na struktuře 1IPB tento problém nevznikl, smyčka je naměřená s dinukleotidem čepičkové struktury a proto předpokládám, že je jím smyčka stabilizována (jak vidíme na obr. 13). Součástí sgstt-smyčky je Lys206, jenž má zásadní vliv na afinitu aptameru k eIF4E. Při interakci s bivalentem čepičky je jeho postranní řetězec orientován do prostoru (obr. 13, oranžově) a s druhým nukleotidem neinteraguje. Horní smyčka kvasinkého eIF4E narozdíl od lidské je delší – sekvence aminokyselin Pro, Ala, Val, Asp (na obr. 12 znázorněné modře; pavd-smyčka). Další znázorněné struktury na obr. 12 a 13 jsou aminokyseliny přímo interagující s aptamerem, vykazující odlišnosti v uspořádání mezi druhy (Lys a Arg) a také aminokyselina, které svým uložením na pohyblivé smyčce může mít také vliv na uvolnění vstupu pro aptamer. U kvasinek je to Ser201 a u lidí je to Asp202 na obrázcích značené šedě. Z mého pozorování vyplynulo, že kvasinková struktura je mnohem víc uzavřená a aminokyseliny vyskytující se v oblasti důležité pro vazbu aptameru zabírají poměrně velký prostor, což může mít za následek znemožnění vazby aptameru.

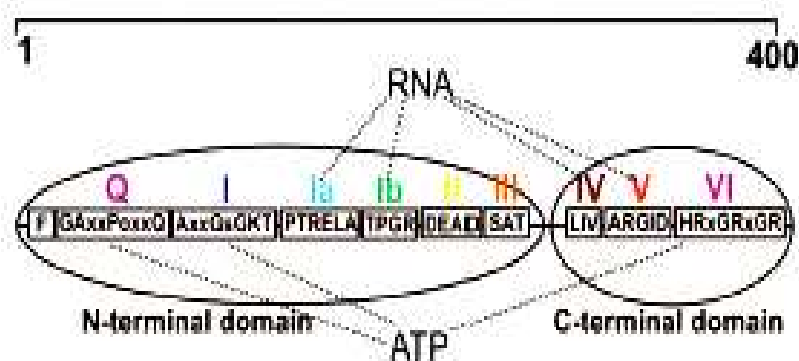
3.2 eIF4A

3.2.1 eIF4A translační faktor a jeho aptamery

eIF4A je RNA dependentní ATPáza, která v buňce může cyklovat mezi volným a navázaným stavem v eIF4F komplexu (Conroy *et al.* 1990; Yoder-Hill *et al.* 1993). Kinetické a termodynamické analýzy také dokazují, že pro správnou funkci eIF4A a vazbu s RNA je vazba s ATP nutná - vazebná a helikázová aktivita jsou spojené funkce (Rogers *et al.* 2001). eIF4A patří do skupiny DEAD-box helikáz, jejichž název je odvozený od motivuII, který je jejich součástí a je složený z Asp-Glu-Ala-Asp sekvence (DEAD) (Linder *et al.* 1989).

Jsou známy tři genové produkty eIF4A: eIF4AI, eIF4AII a eIF4AIII (Nielsen *et al.* 1988). eIF4A má sedm až devět motivů: Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V, and VI (Cordin *et al.* 2004). MotivI váže ATP, motivII zodpovídá za ATP hydrolýzu a pojí hydrolýzu s helikázovou aktivitou, motivIII má helikázovou aktivitu a motivVI je zodpovědný za vazbu na RNA (Pause *et al.* 1993).

Jak bylo řečeno v předchozí kapitole o translačních faktorech a jak je vidět z obrázku 14 (Schutz *et al.* 2008), eIF4A má „dumbbell“ strukturu – dvě domény spojené aminokyselinovými zbytky (Cheng *et al.* 2005). Oguro se snažil zjistit, zda aptamery interagují s každou doménou zvlášť, nebo pouze s celou délkou eIF4A (Oguro *et al.* 2003).



Obrázek 14 eIF4A, rozložení vazebných míst pro ATP a RNA. Barevně značené funkční domény – Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V a VI (Schutz *et al.* 2008).

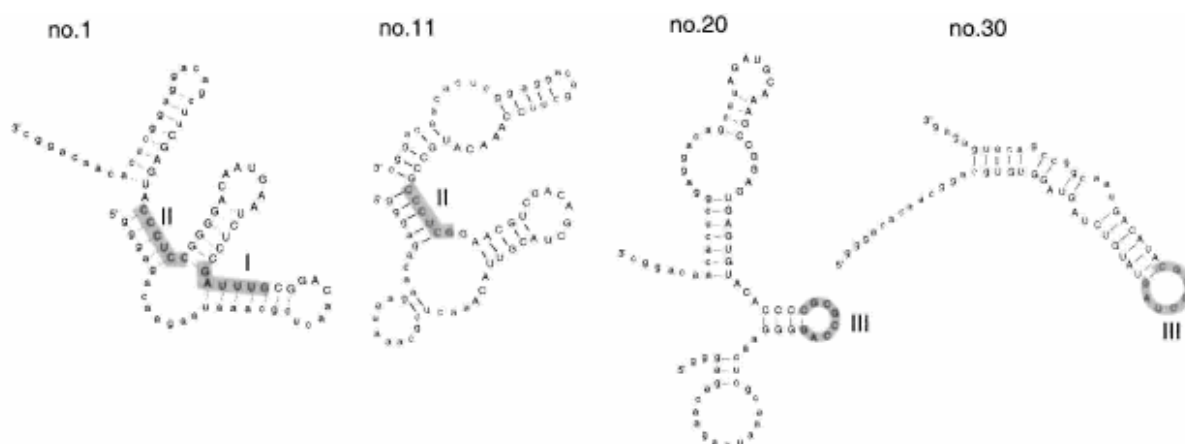
Oguro *et al.* získali aptamery pomocí Selexu, aby jimi charakterizovali vlastnosti eIF4A při vazbě na RNA a iniciaci translace. Aptamery, po navázání na eIF4A, brání ATP hydrolýze a tím pádem funkčnosti eIF4A a iniciaci translace (Oguro *et al.* 2003). Oblast, na kterou se vážou aptamery, má vysoký výskyt argininů (Caruthers *et al.* 2000). Při snaze zvýšit tuto afinitu byl přidán další arginin do konzervovaného motivu eIF4A. Tím se argininový řetězec ještě rozšířil a vazbu RNA na substrát zlepšil (Oguro *et al.* 2003).

Pokud by se ukázalo, že některé ligandy jsou schopné zastavit translaci, jedno z jejich využití by mohlo být právě při léčbě nádorových onemocnění.

3.2.2 Příprava aptamerů

Při selekci aptamerů byla použita plná délka eIF4A a RNA „pool“ molekul pozměněných na 30-40ti nukleotidových místech. Na eIF4A byla připevněna His-kotva, která se váže na Ni-NTA agarósu a tím brání vymytí tohoto faktoru při přípravě.

Selekce probíhala jak za přítomnosti, tak bez přítomnosti ATP. Poté se zjišťovaly rozdíly mezi aptamery v závislosti na přítomnosti ATP, ale nebyly získány žádné významné rozdíly v afinitě. Z každé ze tří selekcí se získalo 48 RNA aptamerových sekvencí, u nichž byla dále zjišťována sekundární struktura. Podle této struktury byly aptamery rozříděny. Produkty ze selekce I rozdělujeme do dvou skupin: skupina 1 obsahuje element I (G/CU/AUUAG) a element II (C/GCUCCC), skupina 2 obsahuje pouze element II. Ze selekce II a selekce III byly získány produkty, u kterých nacházíme pouze element III (GAC/UCGCGC). Všechny tyto informace jsou shrnuté na obrázku 15 (Oguro *et al.* 2003).



Obrázek 15 Predikované struktury aptamerů. Produkty ze selekce I - skupina 1 (no.1) obsahuje elementy I a II, skupina 2 (no.11) má pouze element II. Produkty ze selekce II a III (no.20 a 30) obsahují pouze element III (Oguro *et al.* 2003).

3.2.3 Kooperativní interakce mezi RNA aptamery a eIF4A doménami

Pro upřesnění vazebných míst na eIF4A pro aptamer byla eIF4A struktura rozdělena na dvě části dle domén a pro kontrolu se nechala celá struktura eIF4A. Z výsledků vyplynulo, že kooperativní interakce obou domén eIF4A jsou důležité pro pevnou vazbu aptameru. Neváže se na samostatné domény, ale na celou eIF4A i přes absenci ATP. Oguro vyslovil myšlenku, že ATP nepodporuje změnu konformace, ale stabilizuje uzavřenou aktivní formu a napomáhá ustanovení rovnováhy aktivního stavu (Oguro *et al.* 2003).

3.2.4 Vliv aptamerů na ATPázovou aktivitu

Při zjišťování jak aptamery ovlivňují ATPázovou aktivitu, bylo prokázáno, že aptamery tuto vlastnost inhibují anebo ji alespoň snižují. Většina vybraných RNA aptamerových sekvencí v různých selekčních metodách inhibuje v určitém rozsahu ATPázovou aktivitu bez ohledu na jejich široké spektrum disociačních konstant (Kd) v interakcích s eIF4A. Aptamery, kterými se zde zabývám, jsou v podstatě jediné podrobně popsány a na obou pracovala skupina dr. Nakamury. Jde o aptamer no.20 (Oguro *et al.* 2003), a potom o aptamer no.21, který byl podrobněji popsán později (Sakamoto *et al.* 2005).

Pomocí ribonukleáz byla získána představa o sekundární struktuře aptameru no.20. Tato struktura navíc nasvědčuje tomu, že smyčka 1 a vnitřní oblast smyčky 1 mohou interagovat a podílet se na terciární struktuře. Aby se zjistilo, které zbytky jsou hlavní pro vazbu na eIF4A, bylo vytvořeno pomocí mutagenní PCR a poté charakterizováno

přes 100 variant RNA aptamerů no.20. Oguro zjistil, že delece na 3'-konci maximálně 6ti bazí a delece na 5'-konci maximálně 23 basí aptameru no.20 nezmění afinitu k faktoru, ale pokud se odstraní tyto oblasti i s okolními bázemi, ztratí se potom vazebná schopnost k eIF4A. Z pozorování vyplývá, že pro vysokou afinitu k eIF4A je důležité zachovat celou strukturu hlavní sekvence (sekvence po delecí 3'- a 5'- konce) (Oguro *et al.* 2003).

Jako další aptamer pro charakterizaci vlastností byl vybrán aptamer no.21, který vykazuje nejvyšší afinitu k eIF4A. Bylo zjištěno, že pro účinnou vazbu je nutná 58 nukleotidová vnitřní sekvence aptameru no.21, který má celkovou délku 87 nukleotidů. Pro NMR analýzu byl použit tento vnitřní úsek aptameru - APT58. Dále při zjišťování, které části spolu působí a jsou důležité pro vazbu jak APT58, tak eIF4A byly rozděleny na části, což mělo za následek snížení afinity, proto se předpokládala několikanásobná interakce mezi těmito dvěma molekulami (Sakamoto *et al.* 2005).

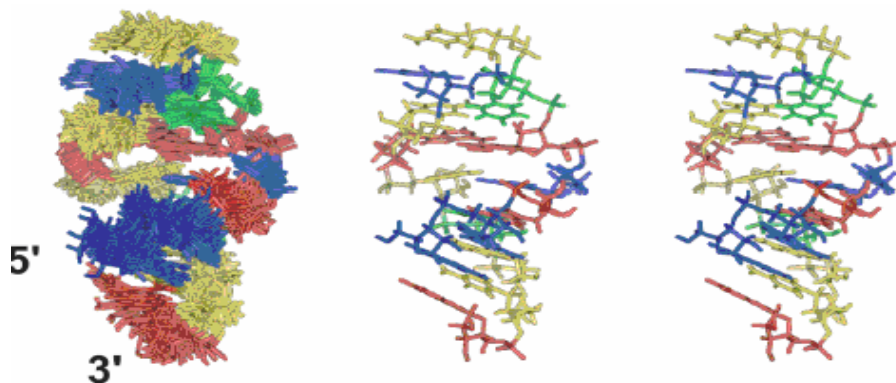
Aby pochopili, jak APT58 rozpoznává eIF4A, určili Sakamoto *et al.* strukturu dvou základních smyček (AUCGCA a ACAUAGA) pomocí NMR spektroskopie a podle toho rozdělili APT58 do samostatných aptamerů: APT15 a APT16. APT15 obsahuje smyčku AUCGCA. Ta je stabilizována U-turn motivem a obsahuje nekanonické vazby A:A bazí. Objevuje se zde Hoogsteenovo párování. APT16 má smyčku ACAUAGA, která je stabilizována AUA nukleotidovým motivem smyčky. Obsahuje jiný typ A:A vazby, nacházíme zde Watson-Crickovo párování.

Vzhledem ke známé struktuře a funkční schopnosti APT58 se naskytla otázka, v čem se liší dané smyčky, zda AUCGCA smyčka není přímo zahrnutá v interakcích s eIF4A a zda ohebnost smyčky ACAUAGA je důležitá pouze pro podporu interakcí aptameru. Analýzy ukázaly, že každá z těchto smyček má důležitý vliv na afinitu aptameru k eIF4A. Bylo zjištěno, že C7 a C9 ze smyčky AUCGCA mohou přímo interagovat s eIF4A. Naopak u smyčky APT16 bylo díky mutačním analýzám potvrzeno, že tato smyčka netvoří přímé interakce s eIF4A, ale je důležitá pro jeho vazbu (Sakamoto *et al.* 2005).

3.2.4.1 Struktura AUCGCA smyčky aptameru 15 (APT15)

Ve smyčce mezi bázemi A5 a A1 se vyskytuje Hoogsteenovo párování. Aptamer 15 je stabilizován U-turn motivem, což je běžný strukturní motiv vyskytující se v různých RNA, ale primárně se vyskytuje v interakcích s proteinem nebo RNA. Prvně byl objeven v antikodonové smyčce tRNA pro fenylalanin a funkčně slouží ke stabilizaci „stacked“ konformace antikodonu (Quigley *et al.* 1976). Nejdůležitější vlastností U-turn motivu je přetočení fosfodiesterové kostry spojené s U-zbytky a dvěma specifickými vodíkovými

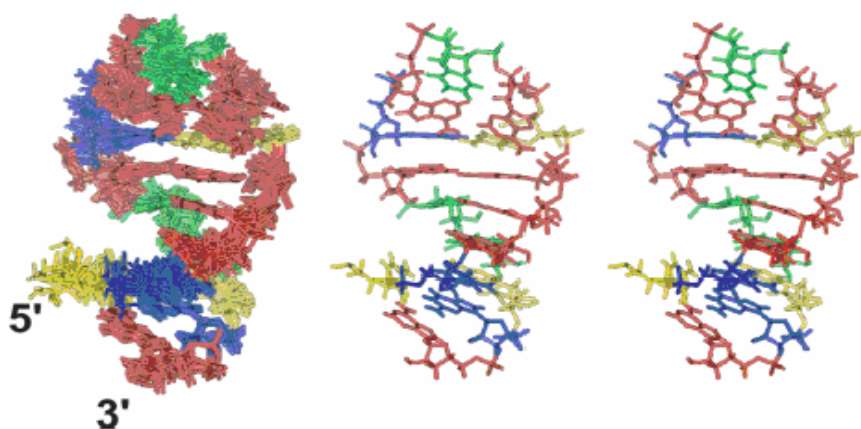
můstky vedoucími přes smyčku, tzv. „cross-loop“. U-turn stabilizuje konformaci smyčky pomocí vodíkových můstků mezi N3 z U6 a fosfáty z G8, C9 a dále pomocí vodíkových můstků, které tvoří 2'OH z U6 s N7 z G8; struktura naznačena na obr. 16 (Sakamoto *et al.* 2005).



Obrázek 16 3D struktura APT15. Modře jsou znázorněné guanosiny, červeně adeniny, zeleně uridiny a žlutě cytosiny. Můžeme zde vidět nekanonické párování A:A bází (červeně horní část struktury) a U-turn motiv stabilizující strukturu vazbami s guanosinem a cytosinem (Sakamoto *et al.* 2005).

3.2.4.2 Struktura ACAUAGA smyčky aptameru 16 (APT16)

Smyčka aptameru 16 obsahuje nekanonické vazby A:A, Watson-Crickovu vazbu G:C a AUA nukleotidovou smyčku. Podobná struktura, jako je AUA triplet, se objevuje například v BMV RNA, kde je rozpoznávána virovou replikázou (Kim *et al.* 2000; Kim *et al.* 2001). Struktura AUA je stabilizována pomocí vodíkových můstků mezi N6 A36 a fosfáty A34 a C35. Přesto je termodynamicky nestabilní díky nekanonickému A:A párování, které přidává mezi řetězce vzdálenost a tím způsobuje nestabilitu aptameru 16; struktura naznačena na obr. 17 (Sakamoto *et al.* 2005).



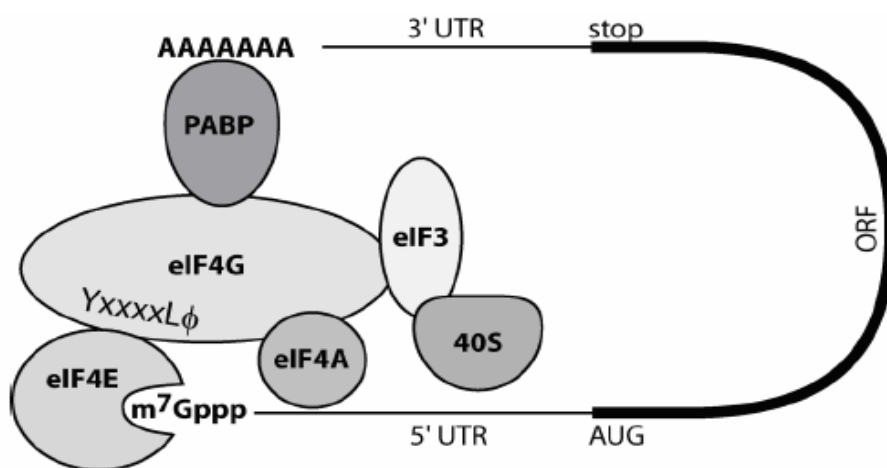
Obrázek 17 3D struktura aptameru 16 Modře jsou znázorněné guanosiny, červeně adeniny, zeleně uridiny a žlutě cytosiny. Můžeme zde vidět AUA smyčku (horní část struktury) a nekanonické A:A párování bází (Sakamoto *et al.* 2005).

3.3 eIF4G

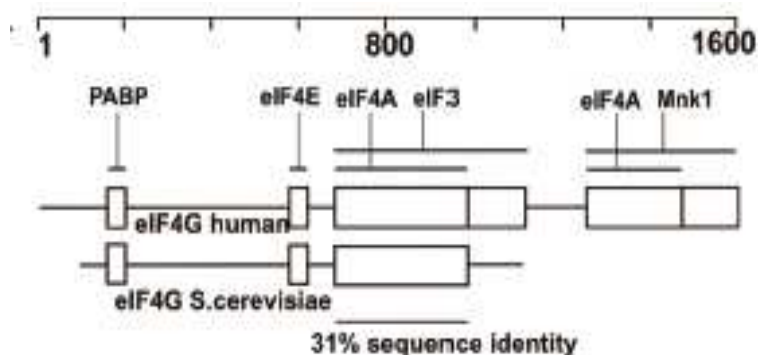
3.3.1 eIF4G translační faktor a jeho aptamery

Translační faktor eIF4G má důležitou roli v iniciaci translace, je to tzv. „scaffold protein“. Na obr. 18 můžeme vidět, které interakce jsou možné díky jeho struktuře.

Jak bylo popsáno v kapitole 2.3.3, savčí i kvasinkové eIF4G můžeme rozdělit na tři části N, M a C, ale kvasinkové eIF4G je mnohem menší. Savčí M- doména obsahuje oblast bohatou na arginin a HEAT doménu, která zprostředkovává vazbu s RNA (Lomakin *et al.* 2000). Na obou izoformách eIF4GI i eIF4GII se nachází dvě místa pro zprostředkování vazby na RNA, jedno je před HEAT doménou na N-konci a jedno je přímo součástí HEAT domény (Marcotrigiano *et al.* 2001), viz obr. 19.



Obrázek 18 eIF4G vázající na svém povrchu translační faktory. PABP pomáhá změnit konformaci mRNA a tím usnadňuje znovunasednutí ribosomu při opakované translaci (Nelson 2008).



Obrázek 19 Srovnání kvasinkového a lidského eIF4G. Jsou znázorněné oblasti, kam se vážou ostatní translační faktory. Na kvasinkové eIF4G chybí C-doména (Schutz *et al.* 2008).

3.3.2 Příprava aptamerů a jejich vlastnosti

Abychom byli schopni určit jakých všech procesů se eIF4G v buňce účastní, Miyakawa *et al.* vyvinuli aptamery proti tomuto faktoru. Byly zjištěné dvě různé skupiny aptamerů schopné interagovat s tímto faktorem. První skupina se váže do MC oblasti (spojené M- a C- domény v jeden fragment), druhá skupina se váže do M- oblasti, kde ale neruší vazbu s eIF3 a eIF4A, jak bychom předpokládaly, přesto ale stále inhibuje iniciaci translace.

Po dvanácti opakováních selekce bylo získáno 48 RNA sekvencí, ze kterých byly vybrány pro další práci nejvíce se vyskytující – aptamer4, aptamer3 a aptamer5. Aptamery 3 a 4 se mezi sebou liší pouze na dvou pozicích. Sekundární struktura aptamerů byla vytvořená pomocí softwarového programu MFOLD na základě jejich složení. MFOLD pro aptamer3 narozdíl od aptameru4 navrhnul čtyři možné struktury, z nichž pouze jedna byla stejná jako u aptameru4. V této „izoformě“ aptameru3 výše zmíněná záměna na dvou pozicích nezpůsobila žádnou změnu v párování (Zuker 2003). U všech 3 typů aptamerů se vyskytuje motivI. Zatímco aptamer5 (obr. 21) obsahuje pouze motivI, aptamery 3 a 4 (funkčně zařazené do jedné skupiny a vázající se na MC-fragment) obsahují ještě navíc motivII (obr. 20). MotivI se skládá z CAGUCGCA a motivII obsahuje UGUCG. Nejeefektivněji se na eIF4G váže aptamer3.

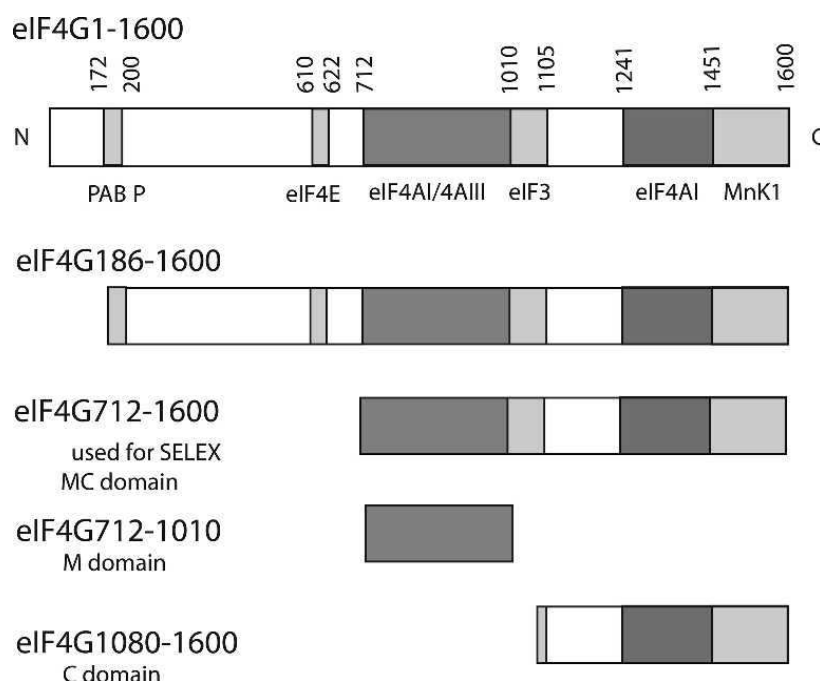


Obrázek 20 Aptamer 4 s vyznačenou záměnou basí (U:A -> C:G) pro aptamer 3. Na obou aptamerech se vyskytují motivy I a II (Miyakawa *et al.* 2006).



Obrázek 21 Aptamer 5 má pouze motivI (Miyakawa *et al.* 2006).

Pro větší upřesnění, kam se aptamery na eIF4G váží, uskutečnili Miyakawa *et al.* pokus, kdy rozdělili faktor na více částí. MC-fragment v rozsahu 712-1600 váže aptamer4 třikrát silněji než M-doménu v rozsahu 712-1010. Stejně tak i aptamer5 váže silněji MC-fragment než M-doménu, ale ve srovnání s aptamerem4 je tato vazba 15krát slabší, tzn. že aptamer4 tvoří pevnější vazbu. Aby dokázali přesně určit, na kterou doménu se který aptamer váže, vytvořili zkrácenou formu C-domény (1080-1600 AK) a pozorovali vazbu aptameru4 a 5. Zjistili, že aptamer4 se váže jak na M-doménu, tak na C-doménu z MC-fragment, zatímco aptamer5 se váže pouze na M-doménu, což dokládají i srovnávací studie o síle vazby (Miyakawa *et al.* 2006), viz obr. 22.



Obrázek 22 eIF4G a jeho domény s vazebnými místy pro transalční faktory, které jsou vypsané v horní části obrázku pod plnou délkou eIF4G faktoru (Miyakawa *et al.* 2006).

Protože eIF4G váže více faktorů, bylo potřeba zjistit, zda aptamery dokážou těmto faktorům ve vazbě bránit. Ukázalo se, že aptamer4 brání vazbě eIF4AI k eIF4G, zatímco aptamer5 tuto vazbu nijak významně nenarušuje (Miyakawa *et al.* 2006). Stejně tak zjišťovali vliv na eIF4AIII, který se z 65% podobá eIF4AI a váže se pouze do M-domény eIF4G, ale jeho funkce je inhibiční (Li *et al.* 1999). Aptamer5 opět vazbu nijak nenarušoval, aptamer4 jí ovlivnil slabě, přesto natolik, že se dala zaznamenat silněji než u eIF4AI. To je možné vysvětlit tím, že eIF4G má dvě vazebná místa pro eIF4AI, ale pro eIF4AIII má vazebné místo pouze jedno. Aptamer4 brání také navázání faktoru eIF3 na eIF4G zatímco

aptamer5 ne (vazebná místa pro eIF4A/eIF4AIII a eIF3 spolu sousedí). Z těchto výsledků vyplývá, že aptamer4 je pro inhibici translace důležitý. Naproti tomu aptamer5 sice váže M-doménu, ale nebrání navázání faktorů eIF3 a eIF4A. Místo pro vazbu dalšího faktoru (eIF4E) leží v blízkosti M-domény, ale aptamer5 s ním neinteraguje, tuto funkci opět zastává aptamer4, který s ním slabě interaguje. Aptamer5 ale i přesto brání iniciaci translace – ještě nezjištěným mechanismem. Proto by se mohlo říct, že je mnohem účinnější než aptamer4, protože k inhibici translace v podstatě nepotřebuje interagovat s žádným z faktorů (Miyakawa *et al.* 2006).

4 Výhody a nevýhody využívání aptamerů v klinické praxi

4.1 Vznik aptamerů

Aptamery se začaly vyrábět na začátku 90. let, kdy se rozvinula *in vitro* metoda Selex, která je založena na evoluci, oddělení a selekci nových funkčních molekul. První pokusy s využitím této metody a jejich produktů se uskutečnily při zkoumání translace a její regulace v T4 bakteriofágovi (Tuerk *et al.* 1990).

V druhé polovině 90. let vznikla metoda Cell-Selex, kdy se selektují molekuly proti specifickým povrchům buněk. Tyto povrchy se liší jak podle typu buňky, tak i podle jejího stáří a stavu. Toho se využívalo hlavně při diagnostice nádorových onemocnění.

4.2 Využití v klinické praxi

Většina poznatků o funkčnosti aptamerů byla zatím získána na základě *in vitro* pokusů. S přibývajícími vědomostmi se začalo s *in vivo* studiemi na zvířatech. V roce 2004 byly provedeny první testy na lidech. Využití aptamerů, pokud se uvedou do praxe, může být velmi široké. Tyto malé molekuly jsou velice flexibilní a v podstatě se vážou i na molekuly, které za normálních podmínek nejsou schopné vázat nukleové kyseliny (viz kapitola 2.2.2 vazba na trombin).

Přestože se zdá být jejich použití velmi jednoduché, hlavní otázkou bylo a v mnoha případech stále zůstává, jak dostat aptamery ke konkrétní poškozené tkáni či buňce. Vzhledem k rychlému rozkladu aptameru (kapitola 2.2.2) je důležité, aby nebyl při cestě organismem poškozen jak sekvenčně, tak strukturně. Aby se tomu zabránilo, přišli vědci s nápadem ukotvit aptamery na nanočástice. V takovém případě aptamery slouží jako agens

rozpoznávající poškozenou buňku a nanočástice obsahují funkční molekuly, které se po kontaktu s buňkou z ní vylíjí a ovlivní procesy v buňce.

Další možností je využití vzájemné interakce RNA aptameru s siRNA. siRNA chrání RNA aptamer při průchodu organismem k místu určení, který zde naopak pomůže siRNA dostat se do konkrétní buňky. Například Zhou *et al.* se právě touto metodou snažili přenést siRNA do buňky infikované virem HIV a tím zastavit jeho replikaci (Zhou *et al.* 2009).

Při léčbě HIV by byla aplikace této metody účelnější než stávající léčba právě proto, že by se tím zabránilo množení viru a docílilo by se jeho odstranění z populace. Faktem je, že v dnešní době se stále ještě používají medikamenty kombinované z látek, které zastavují reverzní transkripci a maturaci virového gag proteinu, čímž pouze zpomalují průběh nemoci.

Další z vlastností aptamerů, je lokalizace cíleného proteinu. Kromě ní, docílí aptamer inhibice funkce tohoto proteinu, čímž ovlivní následné procesy v dané buňce.

O aptamerech proti translačním faktorům jsem se zmiňovala v kapitole 3, zde pro ilustraci uvádím některé případy, ve kterých by se využít mohly a ve kterých se využívají při léčbě nádorových onemocnění. Faktor eIF4E je spojován s rakovinami, kdy je indikována jeho zvýšená hladina v buňce. Tato hladina zvyšuje výskyt angiogenních faktorů, růstového faktoru endotelových buněk (VEGF) a fibroblastového růstového faktoru (FGF). Jeden z druhů rakoviny spojovaný se zvýšenou hladinou eIF4E je karcinom hlavy a krku tzv. HNSCC - head and neck squamous cell cancer. Tento typ rakoviny je velice agresivní, lidé s diagnózou HNSCC žijí maximálně pět let po zjištění onemocnění (Nathan *et al.* 2001), protože se detekuje až v pozdním stadiu, kdy léčba už není efektivní. Základem pro úspěšnou léčbu je časně zjištěná diagnóza tohoto onemocnění. Zvýšená hladina eIF4E se také indikuje i u rakoviny prsu, střev a sarkomů (Byrnes *et al.* 2006).

První klinické testy u lidí byly v roce 2004 provedeny na aptameru proti VEGF, který při nadměrné signalizaci v oku způsobuje ztrátu vidění zvýšením tvorby cév. Má název pegaptanib (prodejný název Macugen), jedná se o kovalentně navázaný aptamer na polymer polyethylenglykol tzv. pegylovaný. Klinické výsledky dokazují, že podávání Macugenu zpomaluje ztrátu vidění. Testy byly prováděny na skupině 294 lidí, kterým se podávala dávka každých 6 týdnů po dobu 2 let. Všeobecně nejlepších výsledků bylo dosaženo během prvního roku podávání (<http://www.macugen.com/treatment.asp>).

Dalším ze zkoumaných aptamerů byl AS1411 známý také jako AGRO100 (Girvan *et al.* 2006), který je bohatý na guanin a tvoří G-quadruplexy. Původně se testoval proti rakovině ledvin, ale s postupem času se zjistilo, že může ovlivňovat i jiné druhy rakovin. Jednou z nich je například akutní myeloidní leukemie (AML), jak uvádí zástupce firmy Antisoma: Glyn

Edwards, CEO of Antisoma, said: "We have taken a critical look at the renal cancer market and decided not to pursue development of AS1411 for this indication (renal cell cancer – pozn.). We are, however, very encouraged to see further evidence of activity with AS1411, and are now focusing our efforts around this drug on the forthcoming trial in AML, a setting where we have already reported positive data from a randomised phase II trial." (<http://www.antisoma.com/asm/media/press/pr2009/2009-12-16/>). Proti AML se vyrábí i další aptamery KH1C12, KK1B10 a KK1D04, které ale ještě nepřešly do testovací fáze na lidech (Sefah *et al.* 2009).

Translační faktory eIF4A a eIF4G jsou další, které jsou skloňovány v souvislosti s rakovinovým onemocněním. Aby eIF4A mohl správně fungovat, potřebuje ke své činnosti vazbu na eIF4G. Jak fungují je blíže popsáno v kapitolách 2.3.2 a 2.3.3, doplňující informace jsou v kapitolách 3.2.1 a 3.3.1.

V buňkách myšího karcinomu kůže byla detekována nadměrná koncentrace eIF4A a aktivita transkripčního faktoru AP-1 (Yang *et al.* 2003), který má vliv mimo jiné na vznik rakoviny prsu (Bamberger *et al.* 1999). V myší buňce proti eIF4A přirozeně působí molekula Pdcd4. U lidí jsou známy dva homology Pdcd4, které se ale od Pdcd4 liší svým umístěním v buňce. Pdcd4 se váže na faktory v různých místech. Může se vázat jak na volné eIF4A, tak se může vázat na komplex eIF4A/eIF4G a zároveň tak brání vazbě s C-doménou eIF4G, tudíž eIF4A není schopné podpořit iniciaci translace. Pdcd4 svou přímou vazbou na eIF4A také brání hydrolýze ATP (Yang *et al.* 2003). Zkoumané aptamery proti eIF4A sice nemají vliv na vazbu s eIF4G, přesto svými účinky zabraňují hydrolýze ATP. Důsledky přítomných molekul jsou ale stejné, je zastavena translace a zabráněno transformaci buňky.

5 Závěr

Na závěr mé práce bych ráda vyzdvihla několik zajímavých informací, které se vztahují také k probíhajícím výzkumům a pokusům. Translace v eukaryotické buňce je dobře probádána na kvasinkách. Jako základní modelový organismus je brána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, hlavně díky její snadné a rychlé kultivaci. Přesto se dozvídáme stále mnoho nových věcí, které upřesňují dosažené vědomosti nebo je zcela vyvrací. Dříve se předpokládalo, že translace, tak jak funguje u kvasinek, funguje i u ostatních eukaryotických druhů. Ale jak se prokázalo, existuje mnoho rozdílů a jsou často významné, například pokud jde o regulaci translace. Kvasinkový a savčí eIF4G se liší v počtu vazebných míst pro eIF4A, proto jsou také potřebná různá množství regulátorů pro vazbu eIF4A

na eIF4G. U kvasinky je pouze jedno vazebné místo pro eIF4A, proto je ovlivnění translace mnohem víc efektivní než u savců, kde nacházíme dvě vazebná místa. Další odlišnosti jsou i mezi lidským a kvasinkovým eIF4E, jak v posunu aminokyselin, tak v lokálním vzhladu struktury, což samozřejmě vede k jiným specifickým vazbám uvnitř translačního faktoru.

Je také známo, že existují izoformy translačních faktorů, které mohou fungovat jako antagonisté (eIF4AI, II a proti nim účinkuje eIF4AIII). Nebo také mezidruhově homology, které se liší svým umístěním v buňce, ale důsledky jejich působení jsou stejné (kvasinkový Pdc4 a jeho lidské homology, kapitola 4.2).

Všechny tyto rozdíly se musí zohlednit při výzkumech, které v první řadě začínají v *in vitro* podmínkách na buněčných kulturách a na kvasinkách. Ne všechny pokusy jsou dostatečně efektivně reprodukovatelné do *in vivo* prostředí. V roce 1990 byla vypracována metoda Selex, která měla usnadnit získávání informací o translaci v T4 fágovi. Během let byla rozpracována do dalších podskupin (Cell Surface Selex, Differential Selex, Neutral Selex aj.) a nyní se těchto metod využívá v širokém spektru interakcí, v rámci různých druhů organismů, proti různým molekulám a povrchům. V této metodě vznikají aptamery - fragmenty nukleových kyselin, které jsou v určitém místě specificky upravené tak, aby byly schopné vysoce afinitní vazby. Později vznikly peptidové aptamery, které ale nevychází z metody Selex, ale pro jejich získávání se používá kvasinkový dvouhybridový systém.

V posledních letech je čím dál tím větší snaha využívat aptamery v klinické praxi. Největší problém je stále jak tyto molekuly dostat do organismu a k cíli působení, aniž by byly poškozeny organismem. Pár nadějných výsledků už bylo dosaženo – navázáním na nanočástice nebo na siRNA. V tomto případě aptamery slouží jako molekuly přivádějící reakční agens k cíli. Jako funkčních molekul se aptamerů využívá při lokalizování proteinů v buňce, při regulaci buněčných procesů a také při identifikaci cizorodých částic v buňce, jako jsou například viry.

V mé práci jsem se zaměřila na iniciační translační faktor 4F, který je složený z eIF4A, eIF4E a eIF4G. O aptamerech proti těmto translačním faktorům zatím není známo mnoho, ale i přesto je zde snaha o co největší pochopení všech interakcí. Hlavně proto, že translační faktor 4F a jeho podjednotky jsou často detekovány v nestandardních hodnotách při nemocech způsobených transformací buněk, jak je to více zmíněno v kapitole 4.

Všechny mnou popisované aptamery mají stejnou vlastnost týkající se regulace translace - inhibují tento proces. Ne každý aptamer proti konkrétnímu faktoru se ale dá použít

i mezi druhy, jak je to popsáno v kapitole 3.1.4. Na eIF4A se váže více aptamerů, které se mohou lišit svým složením co do počtu funkčních smyček. Jejich vliv na eIF4A je více méně stejný – blokují hydrolýzu ATP a tím zastavují translaci. Vazebná schopnost eIF4E na čepičku je zesilována vazbou na eIF4G. V buňce je vazba s eIF4G negativně regulována 4E-BP, které brání této vazbě. Aptamer1, který je nejvíce popsán, ale ovlivňuje translaci jiným způsobem a to tak, že nasedá do vazebné oblasti čepičky a tím brání jejímu navázání. Z toho plyne, že translace je inhibována, i přes vazbu na eIF4G. Aptamery vytvořené proti eIF4G se mohou vázat do dvou různých oblastí, MC-fragmentu a M-domény, čímž se mezi sebou odlišují. Dochází tak k zabránění tvorby funkčních komplexů eIF4G s jinými translačními faktory.

Také jsem chtěla přiblížit problematiku odlišností iniciačních translačních faktorů mezi druhy. Tento fakt jsem se pokusila zdokumentovat pomocí BLAST metody a Cn3D programu na eIF4E, viz kapitola 3.1. Zaujal mě tím, že i když se eIF4E z kvasinky *S. cerevisiae* liší od lidského eIF4E jen nepatrně a celková struktura proteinu mezi druhy zůstává velmi podobná, v rámci ovlivnění lokální struktury jsou změny v sekvenci výrazné. Také jsem se zaměřila na tento faktor proto, že se ve své diplomové práci budu věnovat eIF4E z kvasinky *Candida albicans* a jeho interakcemi s negativními regulátory 4E-BP (u kvasinek nazývaný p20). Zjištěné rozdíly eIF4E u kvasinek *S. cerevisiae* a lidí nám dávají naději na to, že nebude trvat dlouho a budeme schopni rozlišit (například pomocí aptamerů) i eIF4E lidí a kvasinky *C. albicans*. Vzhledem k tomu, že *C. albicans* působí patogenně je naším cílem získat regulátory právě proti ní. Není vyloučeno, že aptamery jsou naším nejbližším řešením této problematiky. Proto věřím, že má práce je dobrým podkladem pro získání přehledu o funkci a možnostech aptamerů, jejich vlivů na translaci a jejich využití v praxi. Také doufám, že tento materiál poslouží mým kolegům a mně do dalších pokusů a výzkumu, abychom se díky vědomostem o aptamerech dostali za hranice dosud poznaného v rámci molekulární biologie a příbuzných oborech.

6 Použitá literatura

- Bamberger, A. M., C. Methner, B. W. Lisboa, C. Stadtler, H. M. Schulte, T. Loning and K. Milde-Langosch (1999). "Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype." *Int J Cancer* **84**(5): 533-8.
- Bode, W., D. Turk and A. Karshikov (1992). "The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships." *Protein Sci* **1**(4): 426-71.
- Buerger, C. and B. Groner (2003). "Bifunctional recombinant proteins in cancer therapy: cell penetrating peptide aptamers as inhibitors of growth factor signaling." *J Cancer Res Clin Oncol* **129**(12): 669-75.
- Byrnes, K., S. White, Q. Chu, C. Meschonat, H. Yu, L. W. Johnson, A. Debenedetti, F. Abreo, *et al.* (2006). "High eIF4E, VEGF, and microvessel density in stage I to III breast cancer." *Ann Surg* **243**(5): 684-90; discussion 691-2.
- Caruthers, J. M., E. R. Johnson and D. B. McKay (2000). "Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13080-5.
- Cerchia, L., C. L. Esposito, A. H. Jacobs, B. Tavittian and V. de Franciscis (2009). "Differential SELEX in human glioma cell lines." *PLoS One* **4**(11): e7971.
- Cohen, B. A., P. Colas and R. Brent (1998). "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14272-7.
- Cohen, N., M. Sharma, A. Kentsis, J. M. Perez, S. Strudwick and K. L. Borden (2001). "PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA." *EMBO J* **20**(16): 4547-59.
- Colas, P., B. Cohen, T. Jessen, I. Grishina, J. McCoy and R. Brent (1996). "Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2." *Nature* **380**(6574): 548-50.
- Conroy, S. C., T. E. Dever, C. L. Owens and W. C. Merrick (1990). "Characterization of the 46,000-dalton subunit of eIF-4F." *Arch Biochem Biophys* **282**(2): 363-71.
- Cordin, O., N. K. Tanner, M. Doere, P. Linder and J. Banroques (2004). "The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity." *EMBO J* **23**(13): 2478-87.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, L. Skrabanek, M. Ruiz-Gutierrez and K. L. Borden (2005). "eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR." *J Cell Biol* **169**(2): 245-56.
- Ellington, A. D. and J. W. Szostak (1992). "Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures." *Nature* **355**(6363): 850-2.
- Fan, X., H. Shi and J. T. Lis (2005). "Distinct transcriptional responses of RNA polymerases I, II and III to aptamers that bind TBP." *Nucleic Acids Res* **33**(3): 838-45.
- Fang, X. and W. Tan (2009). "Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach." *Acc Chem Res* **43**(1): 48-57.
- Feigon, J., T. Dieckmann and F. W. Smith (1996). "Aptamer structures from A to zeta." *Chem Biol* **3**(8): 611-7.
- Gingras, A. C., B. Raught, S. P. Gygi, A. Niedzwiecka, M. Miron, S. K. Burley, R. D. Polakiewicz, A. Wyslouch-Cieszyńska, *et al.* (2001). "Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1." *Genes Dev* **15**(21): 2852-64.
- Girvan, A. C., Y. Teng, L. K. Casson, S. D. Thomas, S. Juliger, M. W. Ball, J. B. Klein, W. M. Pierce, Jr., *et al.* (2006). "AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin." *Mol Cancer Ther* **5**(7): 1790-9.

- Gradi, A., H. Imataka, Y. V. Svitkin, E. Rom, B. Raught, S. Morino and N. Sonenberg (1998). "A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G." Mol Cell Biol **18**(1): 334-42.
- Guo, K. T., A. Paul, C. Schichor, G. Ziemer and H. P. Wendel (2008). "CELL-SELEX: Novel Perspectives of Aptamer-Based Therapeutics." Int J Mol Sci **9**(4): 668-78.
- He, H., T. von der Haar, C. R. Singh, M. Li, B. Li, A. G. Hinnebusch, J. E. McCarthy and K. Asano (2003). "The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection." Mol Cell Biol **23**(15): 5431-45.
- Hershey, J. W. B. and W. C. Merrick (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. Translational control of gene expression. N. Sonenberg, J. W. B. Hershey and M. B. Mathews. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 33-88.
- Hinnebusch, A. G., T. E. Dever and K. Asano (2007). Mechanism of translation initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Translational control in biology and medicine. M. B. Mathews, N. Sonenberg and J. W. B. Hershey. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 225-269.
- Holstege, F. C., E. G. Jennings, J. J. Wyrick, T. I. Lee, C. J. Hengartner, M. R. Green, T. R. Golub, E. S. Lander, *et al.* (1998). "Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome." Cell **95**(5): 717-28.
- Chen, F., Y. Hu, D. Li, H. Chen and X. L. Zhang (2009). "CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2." PLoS One **4**(12): e8142.
- Cheng, Z., J. Collier, R. Parker and H. Song (2005). "Crystal structure and functional analysis of DEAD-box protein Dhh1p." RNA **11**(8): 1258-70.
- Jolma, A., T. Kivioja, J. Toivonen, L. Cheng, G. Wei, M. Enge, M. Taipale, J. M. Vaquerizas, *et al.* (2010). "Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities." Genome Res.
- Kim, C. H., C. C. Kao and I. Tinoco, Jr. (2000). "RNA motifs that determine specificity between a viral replicase and its promoter." Nat Struct Biol **7**(5): 415-23.
- Kim, C. H. and I. Tinoco, Jr. (2001). "Structural and thermodynamic studies on mutant RNA motifs that impair the specificity between a viral replicase and its promoter." J Mol Biol **307**(3): 827-39.
- Korneeva, N. L., B. J. Lamphear, F. L. Hennigan and R. E. Rhoads (2000). "Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1." J Biol Chem **275**(52): 41369-76.
- Li, Q., H. Imataka, S. Morino, G. W. Rogers, Jr., N. J. Richter-Cook, W. C. Merrick and N. Sonenberg (1999). "Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII." Mol Cell Biol **19**(11): 7336-46.
- Linder, P., P. F. Lasko, M. Ashburner, P. Leroy, P. J. Nielsen, K. Nishi, J. Schnier and P. P. Slonimski (1989). "Birth of the D-E-A-D box." Nature **337**(6203): 121-2.
- Lomakin, I. B., C. U. Hellen and T. V. Pestova (2000). "Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation." Mol Cell Biol **20**(16): 6019-29.
- Long, S. B., M. B. Long, R. R. White and B. A. Sullenger (2008). "Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin." RNA **14**(12): 2504-12.
- Lorenz, C., T. Gesell, B. Zimmermann, U. Schoeberl, I. Bilusic, L. Rajkowitsch, C. Waldsich, A. von Haeseler, *et al.* (2010). "Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts." Nucleic Acids Res.
- Macaya, R. F., P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe and J. Feigon (1993). "Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3745-9.
- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, N. Sonenberg and S. K. Burley (1997). "Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP." Cell **89**(6): 951-61.

- Marcotrigiano, J., I. B. Lomakin, N. Sonenberg, T. V. Pestova, C. U. Hellen and S. K. Burley (2001). "A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery." Mol Cell **7**(1): 193-203.
- Matsuo, H., H. Li, A. M. McGuire, C. M. Fletcher, A. C. Gingras, N. Sonenberg and G. Wagner (1997). "Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein." Nat Struct Biol **4**(9): 717-24.
- McNamara, J. O., 2nd, E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, B. A. Sullenger and P. H. Giangrande (2006). "Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras." Nat Biotechnol **24**(8): 1005-15.
- Miyakawa, S., A. Oguro, T. Ohtsu, H. Imataka, N. Sonenberg and Y. Nakamura (2006). "RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes." RNA **12**(10): 1825-34.
- Mochizuki, K., A. Oguro, T. Ohtsu, N. Sonenberg and Y. Nakamura (2005). "High affinity RNA for mammalian initiation factor 4E interferes with mRNA-cap binding and inhibits translation." RNA **11**(1): 77-89.
- Morino, S., H. Hazama, M. Ozaki, Y. Teraoka, S. Shibata, M. Doi, H. Ueda, T. Ishida, *et al.* (1996). "Analysis of the mRNA cap-binding ability of human eukaryotic initiation factor-4E by use of recombinant wild-type and mutant forms." Eur J Biochem **239**(3): 597-601.
- Morozova, N., J. Allers, J. Myers and Y. Shamoo (2006). "Protein-RNA interactions: exploring binding patterns with a three-dimensional superposition analysis of high resolution structures." Bioinformatics **22**(22): 2746-52.
- Nagel-Wolfrum, K., C. Buerger, I. Wittig, K. Butz, F. Hoppe-Seyler and B. Groner (2004). "The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells." Mol Cancer Res **2**(3): 170-82.
- Nathan, C. O., I. L. Leskov, M. Lin, F. W. Abreo, R. Shi, G. H. Hartman and J. Glass (2001). "COX-2 expression in dysplasia of the head and neck: correlation with eIF4E." Cancer **92**(7): 1888-95.
- Nelson, M. (2008). Translation Regulation in the Early *Drosophila* Embryo. Graduate Department of Biochemistry University of Toronto. Doctor of Philosophy.
- Niedzwiecka, A., J. Marcotrigiano, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, A. Wyslouch-Cieszyńska, M. Dadlez, A. C. Gingras, P. Mak, *et al.* (2002). "Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins." J Mol Biol **319**(3): 615-35.
- Nielsen, P. J. and H. Trachsel (1988). "The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed." EMBO J **7**(7): 2097-105.
- Oberer, M., A. Marintchev and G. Wagner (2005). "Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G." Genes Dev **19**(18): 2212-23.
- Oguro, A., T. Ohtsu, Y. V. Svitkin, N. Sonenberg and Y. Nakamura (2003). "RNA aptamers to initiation factor 4A helicase hinder cap-dependent translation by blocking ATP hydrolysis." RNA **9**(4): 394-407.
- Padmanabhan, K., K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler and A. Tulinsky (1993). "The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer." J Biol Chem **268**(24): 17651-4.
- Pause, A., N. Methot and N. Sonenberg (1993). "The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis." Mol Cell Biol **13**(11): 6789-98.
- Ptushkina, M., T. von der Haar, M. M. Karim, J. M. Hughes and J. E. McCarthy (1999). "Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state." EMBO J **18**(14): 4068-75.
- Pyronnet, S., H. Imataka, A. C. Gingras, R. Fukunaga, T. Hunter and N. Sonenberg (1999). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E." EMBO J **18**(1): 270-9.
- Quigley, G. J. and A. Rich (1976). "Structural domains of transfer RNA molecules." Science **194**(4267): 796-806.

- Rogers, G. W., Jr., W. F. Lima and W. C. Merrick (2001). "Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity." *J Biol Chem* **276**(16): 12598-608.
- Rozen, F., I. Edery, K. Meerovitch, T. E. Dever, W. C. Merrick and N. Sonenberg (1990). "Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F." *Mol Cell Biol* **10**(3): 1134-44.
- Rusconi, C. P., J. D. Roberts, G. A. Pitoc, S. M. Nimjee, R. R. White, G. Quick, Jr., E. Scardino, W. P. Fay, *et al.* (2004). "Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo." *Nat Biotechnol* **22**(11): 1423-8.
- Sakamoto, T., A. Oguro, G. Kawai, T. Ohtsu and Y. Nakamura (2005). "NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A." *Nucleic Acids Res* **33**(2): 745-54.
- Sefah, K., Z. W. Tang, D. H. Shangguan, H. Chen, D. Lopez-Colon, Y. Li, P. Parekh, J. Martin, *et al.* (2009). "Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers." *Leukemia* **23**(2): 235-44.
- Schutz, P., M. Bumann, A. E. Oberholzer, C. Bieniossek, H. Trachsel, M. Altmann and U. Baumann (2008). "Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(28): 9564-9.
- Smith, J. E., C. D. Medley, Z. Tang, D. Shangguan, C. Lofton and W. Tan (2007). "Aptamer-conjugated nanoparticles for the collection and detection of multiple cancer cells." *Anal Chem* **79**(8): 3075-82.
- Spivak-Kroizman, T., D. E. Friedland, C. De Staercke, K. M. Gernert, D. J. Goss and C. H. Hagedorn (2002). "Mutations in the S4-H2 loop of eIF4E which increase the affinity for m7GTP." *FEBS Lett* **516**(1-3): 9-14.
- Stoltenburg, R., C. Reinemann and B. Strehlitz (2007). "SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands." *Biomol Eng* **24**(4): 381-403.
- Tuerk, C. and L. Gold (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science* **249**(4968): 505-10.
- Umehara, T., K. Fukuda, F. Nishikawa, S. Sekiya, M. Kohara, T. Hasegawa and S. Nishikawa (2004). "Designing and analysis of a potent bi-functional aptamers that inhibit protease and helicase activities of HCV NS3." *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*(48): 195-6.
- Volpon, L., M. J. Osborne, A. A. Capul, J. C. de la Torre and K. L. Borden (2009). "Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(12): 5441-6.
- Volpon, L., M. J. Osborne, I. Topisirovic, N. Siddiqui and K. L. Borden (2006). "Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands." *EMBO J* **25**(21): 5138-49.
- von der Haar, T. and J. E. McCarthy (2002). "Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function." *Mol Microbiol* **46**(2): 531-44.
- Wells, S. E., P. E. Hillner, R. D. Vale and A. B. Sachs (1998). "Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors." *Mol Cell* **2**(1): 135-40.
- Wu, Q., M. Tsiang and J. E. Sadler (1992). "Localization of the single-stranded DNA binding site in the thrombin anion-binding exosite." *J Biol Chem* **267**(34): 24408-12.
- Xu, A. and K. Y. Chen (2001). "Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA." *J Biol Chem* **276**(4): 2555-61.
- Xu, D. and H. Shi (2009). "Composite RNA aptamers as functional mimics of proteins." *Nucleic Acids Res* **37**(9): e71.
- Yanagiya, A., Y. V. Svitkin, S. Shibata, S. Mikami, H. Imataka and N. Sonenberg (2009). "Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap." *Mol Cell Biol* **29**(6): 1661-9.
- Yang, H. S., A. P. Jansen, A. A. Komar, X. Zheng, W. C. Merrick, S. Costes, S. J. Lockett, N. Sonenberg, *et al.* (2003). "The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation." *Mol Cell Biol* **23**(1): 26-37.

- Yoder-Hill, J., A. Pause, N. Sonenberg and W. C. Merrick (1993). "The p46 subunit of eukaryotic initiation factor (eIF)-4F exchanges with eIF-4A." J Biol Chem **268**(8): 5566-73.
- Zhou, J., P. Swiderski, H. Li, J. Zhang, C. P. Neff, R. Akkina and J. J. Rossi (2009). "Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells." Nucleic Acids Res **37**(9): 3094-109.
- Zimmermann, B., T. Gesell, D. Chen, C. Lorenz and R. Schroeder (2010). "Monitoring genomic sequences during SELEX using high-throughput sequencing: neutral SELEX." PLoS One **5**(2): e9169.
- Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-15.

Internetové zdroje:

<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>
<http://www.antisoma.com/asm/media/press/pr2009/2009-12-16/>